

## **INFORMATION TO USERS**

**This manuscript has been reproduced from the microfilm master. UMI films the text directly from the original or copy submitted. Thus, some thesis and dissertation copies are in typewriter face, while others may be from any type of computer printer.**

**The quality of this reproduction is dependent upon the quality of the copy submitted. Broken or indistinct print, colored or poor quality illustrations and photographs, print bleedthrough, substandard margins, and improper alignment can adversely affect reproduction.**

**In the unlikely event that the author did not send UMI a complete manuscript and there are missing pages, these will be noted. Also, if unauthorized copyright material had to be removed, a note will indicate the deletion.**

**Oversize materials (e.g., maps, drawings, charts) are reproduced by sectioning the original, beginning at the upper left-hand corner and continuing from left to right in equal sections with small overlaps.**

**ProQuest Information and Learning  
300 North Zeeb Road, Ann Arbor, MI 48106-1346 USA  
800-521-0600**

**UMI<sup>®</sup>**

**UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE**

**ÉLIMINATION SÉLECTIVE DES LYMPHOCYTES B RETROUVÉS  
DANS LES SOURIS B7.2 TRANSGÉNIQUES.**

**Par**

**ALEXANDRE BLANCHETTE**

**Programme d'Immunologie**

**Mémoire présenté à la Faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
maître ès sciences (M.Sc.)**

**Février 2001**



**National Library  
of Canada**

**Acquisitions and  
Bibliographic Services**

**395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

**Bibliothèque nationale  
du Canada**

**Acquisitions et  
services bibliographiques**

**395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada**

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

**The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.**

**The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.**

**L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.**

**L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.**

0-612-74311-X

**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

<b>Tables des matières .....</b>	<b>II</b>
<b>Liste des communications.....</b>	<b>V</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>VI</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>VII</b>
<b>Liste des abréviations .....</b>	<b>VIII</b>
<b>Résumé .....</b>	<b>IX</b>
<b>Introduction .....</b>	
<b>1.1 Co-stimulation lymphocytaire .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Deux signaux pour l'activation des lymphocytes T naïfs .....	1
1.1.2 Molécules CD28/CTLA-4/B7.1/B7.2 .....	2
1.1.3 Co-stimulation par le système CD28/B7 .....	3
1.1.4 Co-stimulation dans les maladies autoimmunes .....	7
1.1.5 Modèles de souris pour l'étude de la co-stimulation .....	9
<b>1.2 Les lymphocytes B .....</b>	<b>11</b>
1.2.1 Stades de maturation des lymphocytes B .....	11
1.2.2 Organes lymphoïdes secondaires .....	13
1.2.3 Différentes populations de lymphocytes B .....	14
1.2.4 Caractéristiques fonctionnelles des lymphocytes B folliculaires, de la zone marginale et B1 .....	17
<b>1.3 Apoptose .....</b>	<b>18</b>

1.3.1 Caractéristiques générales de l'apoptose .....	18
1.3.2 Mécanisme générale de l'apoptose .....	19
1.3.3 Les membres de la famille Bcl-2 .....	20
1.3.4 Mécanisme d'action de Bcl-2 .....	21
<b>But du projet de recherche .....</b>	<b>23</b>
<b>Matériel et méthodes .....</b>	<b>24</b>
2.1 Différentes souris utilisées .....	24
2.2 Isolation des cellules de la moelle osseuse .....	24
2.3 Isolation des cellules de la rate .....	25
2.4 Isolation des cellules des ganglions lymphatiques .....	26
2.5 Isolation des lymphocytes du sang .....	26
2.6 Isolation des lymphocytes B1 .....	27
2.7 Marquage des cellules pour étude en cytométrie de flux .....	28
2.8 Anticorps utilisés pour les marquages .....	29
2.9 Isolation des lymphocytes B à l'aide d'une colonne magnétique .....	30
2.10 Séparation des lymphocytes B MZ et folliculaires de la rate .....	30
2.11 Essais de prolifération des lymphocytes B au LPS .....	31
2.12 Elisa des immunoglobulines de souris .....	32
<b>Résultats .....</b>	<b>34</b>
3.1 L'élimination des lymphocytes B dans les souris B7.2 tg est inhibée par la molécules Bcl-2 .....	34
3.2 L'expression de Bcl-2 provoque une augmentation de cellules B immatures dans les organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2 tg .....	38

3.3 Augmentation du nombre de cellules CD21 <sup>élevé</sup> dans la rate des souris B7.2 tg .....	44
3.4 La majorité des cellules CD21 <sup>élevé</sup> des souris B7.2 tg ont les caractéristiques phénotypiques des lymphocytes B de la zone marginale .....	45
3.5 Les lymphocytes B CD21 <sup>élevé</sup> CD23 <sup>faible</sup> ont des caractéristiques fonctionnelles semblable aux lymphocytes B de la zone marginale .....	50
3.6 Les lymphocytes B1 péritoniales ne sont pas éliminés dans les souris B7.2 tg .....	52
3.7 Expression de B7.2 sur les différentes populations de lymphocytes B des souris B7.2tg .....	55
<b>Discussion .....</b>	
4.1 Rôle de la molécule Bcl-2 dans l'élimination des lymphocytes B .....	57
4.2 Présence accrue des lymphocytes B immatures dans les souris B7.2/Bcl-2.....	58
4.3 Élimination à partir du stade pro-B dans la moelle osseuse. ....	60
4.4 Augmentation des lymphocytes B de la zone marginale.....	60
4.5 Présence des lymphocytes B1 dans les souris B7.2 tg.....	62
4.6 Caractéristiques semblables entre les lymphocytes B1 et MZ.....	62
<b>Conclusions .....</b>	<b>65</b>
<b>Remerciements .....</b>	<b>67</b>
<b>Références .....</b>	<b>68</b>

## COMMUNICATION

### Article:

**Blanchette, A., Bernier, G. et Fournier, S.** The T cell-mediated elimination of B cells in B7.2 transgenic mice occurs through a Bcl-2-inhibitable pathway of apoptosis (soumis à Journal of Immunology).

### Présentations par affiches:

**Blanchette, A., Bernier, G., Paradis, J. and Fournier, S.** Enforced Bcl-2 expression inhibits the T cell-mediated elimination of B7.2 transgenic B cells. 14<sup>ème</sup> Réunion annuelle de la société canadienne d'immunologie, 129, 2000.

**Bernier, G., Paradis, J., Blanchette, A. and Fournier, S.** Accumulation of marginal zone B lymphocytes in mice constitutively expressing moderate levels of the costimulatory ligand B7.2. 14<sup>ème</sup> Réunion annuelle de la société canadienne d'immunologie, 128, 2000.

## LISTE DES FIGURES

<b>FIGURE 1: Représentation des différents stades de maturation des lymphocytes B .....</b>	<b>13</b>
<b>FIGURE 2: Différentes populations de lymphocytes B .....</b>	<b>16</b>
<b>Figure 3: Analyse par cytométrie de flux de la liaison de l'annexin V .....</b>	<b>35</b>
<b>Figure 4: L'expression de Bcl-2 dans les lymphocytes B de la moelle osseuse des souris B7.2 tg .....</b>	<b>37</b>
<b>FIGURE 5: Augmentation des lymphocytes B immatures dans les organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2/Bcl-2 .....</b>	<b>41</b>
<b>FIGURE 6: Augmentation des lymphocytes B CD21<sup>élevé</sup> dans les souris B7.2 tg .....</b>	<b>43</b>
<b>FIGURE 7: Phénotype des souris CD21<sup>élevé</sup> de la rate .....</b>	<b>48</b>
<b>FIGURE 8: Réponse aqu LPS de lymphocytes B Fo et MZ des souris B7.2 tg .....</b>	<b>51</b>
<b>FIGURE 9: Les cellules B1 ne sont pas éliminées dans les souris B7.2 tg.....</b>	<b>54</b>
<b>FIGURE 10: Expression de B7.2 sur les différentes populations de lymphocytes B.....</b>	<b>56</b>



## **LISTE DES TABLEAUX**

**TABLEAU I: Sous-populations de lymphocytes B de la rate et des ganglions lymphatiques de souris transhéniques B7.2, B7.2/Bcl-2, Bcl-2 et de type sauvage .....40**

**TABLEAU II: Sous-populations de lymphocytes B dans la rate des souris B7.2 tg et de type sauvage .....46**

## **LISTE des ABRÉVIATIONS**

**TcR: Récepteur des cellules T**

**CMH: Complexe majeur d'histocompatibilité**

**Kda : Kilo Dalton**

**ARNm: Acide Ribonucléique Nucléaire messenger**

**IL-2, -4, -5, -13 : Interleukine**

**CDK4 et 6: Cycline dependent kinase 6**

**IFN- $\gamma$ : Interféron-gamma**

**CTLA-4: Cytotoxique T Lymphocyte Antigen-4**

**EAE: Experimental Autoimmune Encephalomyelitis**

**NOD: Non-Obese Diabetic mice**

**Lymphocytes B TI : Lymphocytes B transitionnels de type I**

**Lymphocytes B TII : Lymphocytes B transitionnels de type II**

**Lymphocytes B Fo : Lymphocytes B Folliculaires**

**Lymphocytes B MZ : Lymphocytes B de la zone marginale**

**LPS: Lipopolysaccharide**

**A.D.N.: Acide Déoxyribonucléique**

**TNFR: Récepteur du Tumor Necrosis Factor**

**tg : transgénique**

**SA : streptavidine**

**BSA: Bovine Serum Albumin**

**PBS: Phosphate Buffer Saline**

**mCi: milli Curie**

**H.S.A.: Heat Stable Antigen**

**S.V.F.: sérum de veau foetale**

## **RÉSUMÉ**

### **ÉLIMINATION SÉLECTIVE DES LYMPHOCYTES B RETROUVÉS DANS LES SOURIS B7.2 TRANSGÉNIQUES.**

**Par  
Alexandre Blanchette**

**Mémoire présenté au programme d'immunologie  
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M.Sc.)  
Faculté de médecine, Université de Sherbrooke**

L'activation complète des lymphocytes T nécessite deux signaux. Un premier signal donné par l'interaction entre le CMH et le TcR et un second donné par les molécules de co-stimulation entre autres par le système CD28 et B7. Les souris exprimant constitutivement la molécule B7.2 sur leur lymphocytes B voient une grande diminution du nombre de lymphocytes B. L'organe lymphoïde secondaire où l'on retrouve la majorité des lymphocytes B est la rate. Dans cet organe, quatre populations différentes de lymphocytes B sont présentes: les lymphocytes T1, TII, folliculaires et de la zone marginale. Une autre population de lymphocytes B, les lymphocytes B-1, sont présents dans les cavités pleurales et péritoniales et dans une très faible proportion dans la rate. Le but de la présente étude est de déterminer si l'élimination des lymphocytes B dans les souris transgéniques se fait par un processus apoptotique et de déterminer si l'élimination cible une population particulière de lymphocytes B. Nous nous sommes intéressés au rôle probable que peut jouer la molécule Bcl-2 dans le processus d'élimination. Les souris B7.2/Bcl-2 ont des nombres normaux de lymphocytes B dans la moelle osseuse et dans les organes lymphoïdes secondaires. Il y a une augmentation du nombre de lymphocytes B immatures dans les organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2 tg comparativement aux nombres retrouvés dans les souris de type sauvage. Les lymphocytes B de la zone marginale (MZ) ne sont pas éliminés dans les souris B7.2 tg. Au niveau phénotypique et fonctionnel, ces lymphocytes B MZ répondent comme les lymphocytes B MZ des souris de type sauvage. Les lymphocytes B-1 sont également présents dans les souris B7.2 tg et ces derniers, ont des caractéristiques fonctionnelles et phénotypiques semblables à celles retrouvées dans les souris de type sauvage.

**Mots-clés: B7.2, Co-stimulation, Apoptose, Zone marginale, Transgénique**

## **INTRODUCTION**

### **1.1 CO-STIMULATION LYMPHOCYTAIRE**

#### **1.1.1 Deux signaux pour l'activation de lymphocytes T naïfs**

L'activation des lymphocytes T revêt une importance particulière puisque ces cellules jouent un rôle primordial dans la réponse immunitaire. Leur activation complète nécessite deux signaux. Le premier signal est donné par la liaison entre le récepteur à l'antigène des cellules T (TcR) et un peptide antigénique présenté en association avec des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), exprimé à la surface des cellules présentatrices d'antigène. Deuxièmement, un signal de co-stimulation est requis. Une des voies de co-stimulation les mieux caractérisée est celle qui implique l'interaction entre le récepteur CD28 et les membres de la famille B7, B7.1 et B7.2 (Schwartz et al., 1990).

Lorsqu'il n'y a que la liaison du complexe peptide/CMH (signal 1), le lymphocyte T devient anergique (Schwartz, 1989). Par contre, il semble que le signal de co-stimulation en absence d'un signal via le TcR n'ait aucun

effet. Donc, les deux signaux sont nécessaires pour qu'il y ait activation complète des lymphocytes T (Lafferty et Cunningham, 1975).

### **1.1.2 Molécules CD28/CTLA-4/B7.1/B7.2**

Les molécules participant à la co-stimulation par le CD28 font partie de la superfamille des immunoglobulines (June et al., 1994). Le premier membre est le récepteur CD28. Ce récepteur est exprimé de façon constitutive sur les lymphocytes T, tant CD4+ que CD8+ (Linsley et Ledbetter, 1993). Son expression est augmentée lorsque le lymphocyte T est activé (Turka et al., 1990). Ce récepteur est un homodimère de 44 Kda qui peut lier aussi bien B7.1 (Freeman et al., 1989) que B7.2 (Freeman et al., 1993).

L'autre récepteur retrouvé à la surface des lymphocytes T est la molécule CTLA-4 ("cytotoxique T lymphocyte Antigen 4"). Cette protéine est également un homodimère de 44 Kda (June et al., 1994) qui, contrairement au CD28, est exprimé à la surface cellulaire environ 48 heures après activation des lymphocytes T (Lindsten et al., 1993). Le CTLA-4, tout comme le CD28, a comme ligand B7.1 et B7.2 (Linsley et al., 1994). Comparativement au CD28, la molécule CTLA-4 a une affinité supérieure pour B7.1 et B7.2 (Linsley et al., 1991)

Les ligands de ces deux récepteurs, B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) , sont exprimés sur de nombreux types cellulaires. En effet, B7.1 est exprimé sur les lymphocytes B activés, les lymphocytes T activés, les cellules dendritiques et les monocytes (Greenfield et al., 1998) . Pour ce

qui est de B7.2, ce dernier est exprimé sur les lymphocytes T activés, les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques, les lymphocytes B activés et faiblement sur les lymphocytes B au repos (Greenfield et al., 1998). L'activation des cellules présentatrices d'antigène augmentera l'expression de B7.1 et B7.2. Ces molécules ne font pas leur apparition à la surface cellulaire au même moment. B7.2 apparaît rapidement après l'activation à la surface des cellules présentatrices d'antigène alors que la molécule B7.1 apparaît 24 à 48 heures suivant activation de la cellule présentatrice d'antigène. Ces deux protéines se présentent sous une forme monomérique dont la masse est de 55 Kda pour B7.1 et 70 Kda pour B7.2 (Freeman et al. 1993).

### **1.1.3 Co-stimulation par le système CD28/B7**

La co-stimulation a de nombreux effets sur les lymphocytes T stimulés via leur TcR. Cette co-stimulation augmente la survie, la prolifération, la production de cytokines et prévient l'anergie des lymphocytes T.

La liaison du récepteur CD28 avec les ligands B7.1 ou B7.2 augmente la survie des lymphocytes T stimulés suite à la rencontre d'un peptide antigénique. Cet effet est dû à l'augmentation de l'expression de la molécule Bcl-xL (Boise et al., 1995). Cette molécule est un facteur anti-apoptotique. La co-stimulation augmente la sécrétion de l'IL-2 en stabilisant son ARNm et en amplifiant la transcription du gène de l'IL-2 (Lindsten et al., 1989). La prolifération cellulaire est régulée par des protéines du cycle cellulaire. Certaines de ces protéines, entre autre la protéine CDK6 (Nagasawa et al., 1997), voient leur expression augmentée lors de la liaison du CD28 avec les ligands de la famille B7. Cette augmentation permet aux lymphocytes d'entrer dans le cycle cellulaire (Firpo et al., 1994). En plus de l'augmentation de l'expression de protéines du cycle cellulaire, la dégradation de la protéine p27Kip, une protéine inhibitrice du cycle cellulaire, favorise la prolifération des lymphocytes T (Firpo et al., 1994). Finalement, la liaison du CD28 avec les molécules de la famille B7 permet la production de nombreuses cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-13 et l'IFN- $\gamma$  (Lenschow et al., 1996).

La signalisation médiée par le récepteur CD28 est encore difficile à cerner puisqu'il faut faire la distinction entre la signalisation induite uniquement par la liaison du CD28 et la signalisation engendrée par le TcR. La queue cytoplasmique du CD28 comprend plusieurs résidus sérine,

tyrosine et thréonine pouvant être phosphorylés (June et al., 1994). Les événements de signalisation engendrés par le CD28 sont nombreux. Il peut y avoir activation de la PI3K (Nunez et al., 1993) de même que la phosphorylation de nombreuses protéines tyrosines kinases. Parmi les tyrosines kinases phosphorylées il y a entre autres la protéine p56lck et p59fyn (Hutchcroft et Bierer, 1994) de même que les protéines ITK/TEM de la famille Tec (August et al., 1994). D'autres voies de signalisation peuvent être impliquées suite à la liaison du CD28 avec ses récepteurs B7.1 ou B7.2, puisque CD28 possède des motifs SH2 et SH3 reconnus comme étant important pour l'interaction protéine-protéine.

L'autre récepteur impliqué dans ce système, CTLA-4, a un impact totalement opposé. Il joue un rôle d'inhibiteur de la prolifération (Krummel et al., 1996). Le rôle d'inhibiteur joué par CTLA-4 a été montré *in vitro* dans un modèle où il y avait stimulation des lymphocytes T par des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. En ajoutant des anticorps capables d'induire l'aggrégation de la molécule CTLA-4, il y avait inhibition de la réponse des lymphocytes T (Krummel et Allison, 1995). L'étude des souris déficientes pour le gène codant pour le CTLA-4 a été primordiale pour comprendre le rôle du CTLA-4. Dans ces souris, il y a une prolifération accrue des lymphocytes T ce qui cause une splénomégalie et une lymphadénopathie (Tivol et al 1995, Waterhouse et al 1995). La liaison du CTLA-4 avec son ligand est donc un moyen de contrôler la réponse immunitaire. La protéine



CTLA-4 inhibe l'activation des lymphocytes T en bloquant la translocation au noyau du facteur de transcription NF-AT responsable de la transcription du gène de l'IL-2 (Brunner et al., 1999). De plus, la liaison des membres de la famille B7 avec le CTLA-4 empêche l'augmentation de l'expression de différentes protéines du cycle cellulaire, comme la cycline D3, le CDK4 et le CDK6 (Brunner et al., 1999). Comparativement au CD28 qui favorise la dégradation de la protéine p27Kip, le CTLA-4 empêche la dégradation de cette dernière (Brunner et al., 1999).

Le CTLA-4, contient une région cytoplasmique contenant 36 acides aminés qui possède un site propice à la liaison de la sous-unité p85 de la PI3K (SCHNEIDER et al., 1995). Dans les souris déficientes en CTLA-4, il y a une hyperphosphorylation de différentes protéines de signalisation: ZAP-70, Shc, Fyn et Lck (MARENGERE et al., 1996). Cette hyperphosphorylation tend à démontrer que l'activation de CTLA-4 activerait une phosphatase, probablement Shp-2, qui régulerait la phosphorylation de ces protéines et diminuerait la signalisation du TcR (Marengere et al., 1996).

En ce qui concerne les voies de signalisation médiées via les ligands de la famille B7, très peu de choses sont connues. La queue cytoplasmique de la protéine B7.1 est plus courte que la queue cytoplasmique de la molécule B7.2 (Freeman et al., 1993). Il a été montré que la molécule B7.2 possédait trois sites possibles de phosphorylation (Freeman et al., 1993).

La possibilité d'une signalisation via le CD86 a été montrée dans la production de différentes immunoglobulines. En effet, des lymphocytes B purifiés stimulés avec un antigène et un anticorps anti-CD86 voient une augmentation dans la sécrétion d'IgG1 et d'IgE produite (Kasprowicz et al., 2000). Pour l'instant, les voies de signalisations empruntées suite à la liaison du CD86 restent inconnues. Pour B7.1, aucune indication ne permet de croire qu'il peut induire un signal.

De nombreuses études restent encore à faire pour être en mesure de bien comprendre la régulation de ce système de co-stimulation. Cependant, ce système, bien qu'il soit le plus étudié et très important, n'est pas l'unique système de co-stimulation (Mueller, 2000). Donc, une compréhension approfondie de chacun de ces systèmes de co-stimulation est nécessaire pour bien comprendre la régulation du système immunitaire.

#### **1.1.4 Co-stimulation dans les maladies autoimmunes**

Il a été montré que la co-stimulation jouait un rôle important dans le développement de nombreuses maladies autoimmunes. Voici quelques exemples illustrant le rôle de la voie de co-stimulation B7/CD28/CTLA-4.

Une de ces maladies est la sclérose en plaques, ou son pendant murin l'EAE ("Experimental Autoimmune Encephalomyelitis") une maladie caractérisée par une démyélination de la gaine de myéline et une infiltration de cellules immunitaires (Raines et al., 1990). Dans les souris développant l'EAE, il y a présence des molécules B7 sur les cellules de la microglie (De Simone et al., 1995). De plus, les macrophages retrouvés dans les lésions expriment la molécule B7.2 (Windhagen et al., 1985). L'utilisation de molécules CTLA-4-Ig, une molécule empêchant la liaison du CD28 ou du CTLA-4 aux molécules B7, permet de protéger les animaux contre le développement de l'EAE. Cette étude montre l'importance de la co-stimulation dans le développement de cette maladie (Arima et al., 1996).

L'arthrite rhumatoïde est une des maladies autoimmunes les plus répandues. Cette maladie est caractérisée par une infiltration du liquide synoviale par des cellules mononucléaires incluant les monocytes et les lymphocytes T et B qui expriment des niveaux élevés de molécules B7.1 (Verwilghen et al., 1994). Comme pour la sclérose en plaques, le traitement avec la molécule CTLA4-Ig diminue l'incidence de la maladie dans un modèle murin (Webb et al., 1996).

Une autre maladie autoimmune où la co-stimulation prend une part active est le lupus érythémateux. Dans cette maladie il y a une diminution du nombre de lymphocytes T exprimants CD28+ (Kaneko et al., 1996) et

possiblement un défaut d'expression des molécules B7 par les cellules présentatrice d'antigène (Garcia-Cozar et al., 1996).

La bonne compréhension de la voie de co-stimulation B7.2/CD28/CTLA-4 pourra éventuellement avoir de nombreuses répercussions dans la compréhension du développement et le traitement de certaines maladies autoimmunes.

#### **1.1.5 Modèles de souris pour l'étude de la co-stimulation**

L'utilisation de souris transgéniques s'est révélée très utile pour une meilleure compréhension du système de co-stimulation CD28/B7.

L'expression constitutive de B7.1 sur les îlots pancréatiques n'est pas suffisante pour empêcher la tolérance des lymphocytes T aux antigènes pancréatiques (Guerder et al., 1994). L'expression de la molécule B7.2 sur les îlots pancréatiques provoquent une infiltration massive des lymphocytes. Malgré cette infiltration, ces souris ne développent pas le diabète (Guerder et al., 1998). Cependant, lorsque les souris coexpriment la molécule B7.1 ou B7.2 et le CMH de classe II sur les îlots pancréatiques, ces dernières développent une réponse contre les cellules pancréatiques (Guerder et al., 1994, Guerder et al., 1998). Des souris NOD ("non-obese diabetic mice"),

qui développent spontanément le diabète, exprimant la molécule B7.1 sur leurs cellules pancréatiques développent la maladie plus rapidement que les souris de type sauvage (Wong et al., 1995). De plus, aucune inflammation spontanée n'est observée lorsque des souris expriment la molécules B7.1 sur leurs kératinocytes (Williams et al., 1994). Ces modèles indiquent que la seule expression de molécules de co-stimulation B7.1 et B7.2 sur les cellules du parenchyme est insuffisante pour l'activation des lymphocytes aux antigènes du soi.

D'autres modèles murins ont été faits dans lesquels les lymphocytes B expriment un des deux membres de la famille B7. Ces souris ont été produite pour étudier le développement des maladies autoimmunes systémiques. Cependant, ces souris ne développent aucun signe de maladies autoimmunes systémiques. Il y a plutôt une élimination des lymphocytes B par les lymphocytes T (Fournier, et al., 1997, Van Parijs et al., 1997). Des études plus approfondies ont permis de déterminer que cette élimination est dépendante de l'interaction entre le CD28 et le B7.2 (Fournier et al., 1997). Les lymphocytes B exprimant la molécule B7.2 sont plus sensibles à l'élimination par les lymphocytes T car, leur nombre est diminué dans les organes lymphoïdes secondaires alors que les lymphocytes B exprimant B7.1 ne voient pas leur nombre diminués dans les organes lymphoïdes secondaires (Van Parijs et al., 1997). Un aspect intéressant de

cette élimination est qu'il se produit en absence d'une stimulation antigénique.

## **1.2 LES LYMPHOCYTES B**

De nombreux types cellulaires doivent interagir pour qu'une réponse immunitaire adéquate se développe contre un antigène étranger. Les lymphocytes B sont primordiaux pour le développement d'une réponse efficace puisqu'ils jouent des rôles diversifiés. Ces cellules sont responsables de la production des anticorps, peuvent agir en tant que cellule présentatrice d'antigène, peuvent répondre à des antigènes de façon T-indépendante et participer à la réponse naturelle par la sécrétion d'anticorps.

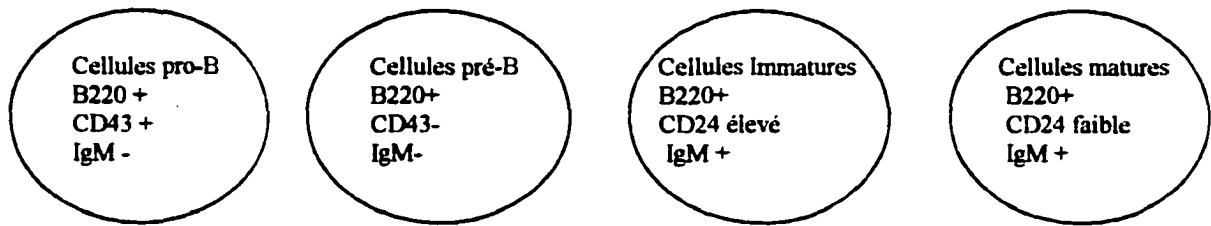
### **1.2.1 Stades de maturation des lymphocytes B**

La maturation des lymphocytes B s'effectue dans la moelle osseuse chez l'adulte (Osmond et al., 1964). Cette activation passe par différents stades soit les stades pro-B, pré-B, immature et mature (Hardy, 1990). Pour la maturation des lymphocytes B, de nombreux facteurs sont importants. Il doit y avoir un contact entre les lymphocytes B et les cellules stromales. Une des molécules d'adhésion importante est la molécule c-Kit exprimée par

les lymphocytes B. La liaison de cette dernière avec le facteur SCF est nécessaire pour le développement des lymphocytes pro-B. Différents facteurs solubles produits par les cellules stromales sont aussi importants. Par exemple, l'Il-7 est essentielle pour le développement des lymphocytes pré-B (Namen et al., 1988). De plus, la présence à la surface cellulaire d'un pré-BCR, au stade pré-B et d'un BCR, au stade immature et mature, est requise (Rajewsky et al., 1996). La signalisation fonctionnelle du pré-BCR et du BCR est requise dans la sélection positive des lymphocytes B (Melchers et al., 1995).

La maturation des lymphocytes B peut se diviser en quatre stades qui se distinguent selon le réarrangement des gènes des immunoglobulines et selon les molécules que les cellules B expriment à leur surface. Les cellules retrouvées à tous ces stades expriment la molécule B220. Les cellules pro-B, qui réarrangent la chaîne lourde de leur immunoglobuline, et pré-B, qui expriment à leur surface leur chaîne lourde et une chaîne légère de remplacement, n'expriment pas l'IgM. Contrairement à ces derniers, les lymphocytes B immatures et matures expriment l'IgM. Les lymphocytes pro-B expriment la molécule CD43 alors que les lymphocytes pré-B ne l'expriment pas. Pour les lymphocytes B immatures et matures qui expriment l'IgM, il est possible de les différencier selon l'expression du CD24. Cette molécule est retrouvée à des niveaux élevés sur les

lymphocytes B immatures et à des niveaux faibles sur les lymphocytes B matures (Rolink et al., 1991, Hardy et al., 1991).



**FIGURE 1:** Représentation des différents stades de maturation des lymphocytes B (adaptée de Rolink et al., 1991).

### 1.2.2 Organes lymphoïdes secondaires

Suite à la maturation des lymphocytes B dans la moelle osseuse, ces derniers migrent dans les organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions lymphatiques et la rate.

Les ganglions lymphatiques sont composés de follicules où l'on retrouve les lymphocytes B alors que les lymphocytes T se retrouvent dans la zone paracorticale.

La rate est morphologiquement différente des ganglions. Elle est composée de deux parties: la pulpe rouge contenant principalement les globules rouges et la pulpe blanche contenant les cellules du système



immunitaire. La pulpe blanche est formée de follicules où l'on retrouve entre autres des lymphocytes B matures, d'une zone péri-artériolaire comprenant des lymphocytes T et des cellules dendritiques et la zone marginale entourant le follicule où de nombreux types cellulaires se retrouvent. Les populations retrouvées dans la zone marginale comprennent entre autre une population particulière de lymphocytes B matures (Keuning et al., 1963), des lymphocytes B mémoires et des macrophages (Snook et al., 1964, Humphrey et al., 1981). La zone marginale est la principale voie d'entrée des antigènes retrouvés dans le sang (Weiss et al., 1977).

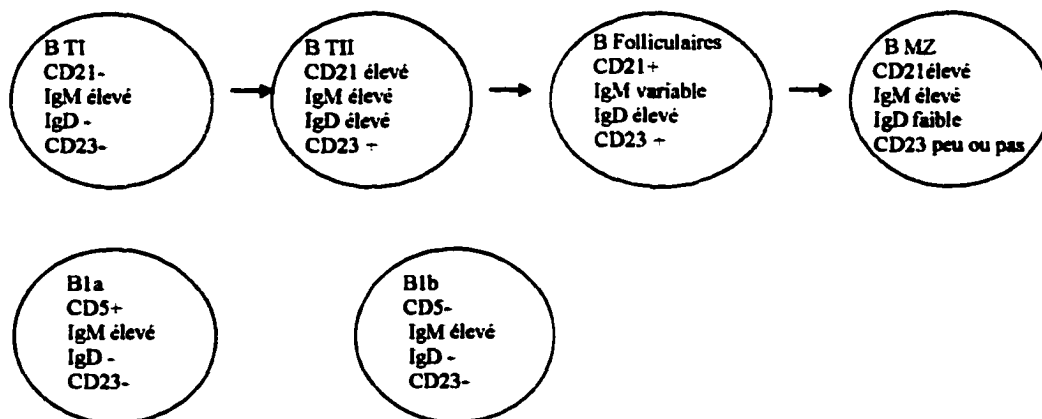
### **1.2.3 Différentes populations de lymphocytes B**

Différentes populations de lymphocytes B sont présentes dans la rate. Ces populations se divisent en deux grandes catégories. D'abord la population retrouvée dans les follicules et celle qui se retrouve dans la zone marginale. Les follicules comprennent les lymphocytes B transitionnels de type I (T1) et transitionnels de type II (T2), de même que les lymphocytes folliculaires matures (Fo). Ces populations peuvent se distinguer selon l'expression de certains marqueurs de surface. Les lymphocytes transitionnels de type I (T1) représentent 5 à 10% des lymphocytes B de la rate. Les cellules T1 sont des cellules B qui viennent de migrer de la moelle osseuse. Ces lymphocytes B expriment l'IgM de façon élevée mais

n'expriment pas le CD21, le CD23 ou l'IgD (Loder et al., 1999). Les lymphocytes transitionnels de type I vont par la suite se différencier en lymphocytes transitionnels de type II (T2). Ces derniers expriment l'IgM, l'IgD et le CD21 de façon élevée et le CD23. Ils représentent environ 15 à 20% des lymphocytes B de la rate (Loder et al., 1999). Les lymphocytes B matures, expriment l'IgD très fortement, les marqueurs CD21 et CD23 modérément et l'IgM de façon variable. Ces lymphocytes B folliculaires représentent la majorité des lymphocytes B de la rate et se retrouvent dans une proportion allant de 65 à 75 %. Les lymphocytes B circulants sont présents dans les ganglions, la rate, le sang et la moelle osseuse (Loder et al., 1999). La dernière population de lymphocytes B (MZ) retrouvée dans la rate se trouve dans la zone marginale et forme 3 à 5% des cellules B de la rate. Il a été proposé que ces cellules dérivent des lymphocytes B folliculaires circulants (Kumararatne et MacLennan, 1981). Ces cellules sont également des lymphocytes B matures possédant un phénotype différent des autres populations. En effet, ils expriment le CD21 et l'IgM de façon élevée mais n'expriment que faiblement l'IgD et peu ou pas le CD23 (Loder et al., 1999).

On retrouve également une autre population de lymphocytes B mature dans les cavités péritoniale et pleurale et dans une très faible proportion dans la rate (Hayakawa et al., 1983). Ces lymphocytes sont appelés lymphocytes B-1 pour les différencier des lymphocytes B-2. Les

lymphocytes B-2 comprennent les lymphocytes B T-I, T-II, Fo et MZ. Deux hypothèses ont tenté d'expliquer l'origine des lymphocytes B-1. La première hypothèse tend à montrer que les lymphocytes B-1 et B-2 proviennent d'un même progéniteur. La spécificité de leur immunoglobuline de surface détermine la différenciation en lymphocytes B-1 ou B-2 (Lam et Rajewsky, 1999). L'autre hypothèse se base sur la présence de progéniteurs différents pour l'origine des lymphocytes B1 et B2 (Kantor et al., 1992). Les lymphocytes B1 sont regroupés en B1a ou B1b (Hayakawa et al., 1983). Les lymphocytes B1a et B1b expriment l'IgM de façon élevée mais n'expriment pas l'IgD ou le CD23. Leur divergence se situe principalement au niveau de l'expression du CD5, cette molécule est retrouvée à la surface des lymphocytes B1a mais est absente des lymphocytes B1b (Herzenberg et al., 1986). Le phénotype des différentes populations de lymphocytes B décrites dans cette section, est résumé à la figure 2.



**FIGURE 2: Différentes population de lymphocytes B**

#### **1.2.4 Caractéristiques fonctionnelles des lymphocytes B folliculaires, de la zone marginale et B1.**

Les différentes populations de lymphocytes B ont des caractéristiques particulières. En plus des différences phénotypiques et topographiques, les caractéristiques fonctionnelles diffèrent d'une population à l'autre.

De nombreuses études ont permis de bien connaître les caractéristiques fonctionnelles des différentes populations de lymphocytes B. Une de ces caractéristiques est la réponse suite à la stimulation via leur immunoglobuline de surface. En effet, les lymphocytes B-1 et les lymphocytes de la zone marginale ne prolifèrent pas suite à une stimulation de leur immunoglobuline de surface contrairement aux lymphocytes B folliculaires (Oliver et al., 1997, Lund et al., 1995). La réponse au LPS, un antigène T-indépendant de type I, est également différente. Les lymphocytes B-1 et de la zone marginale répondent à des doses plus faible et plus rapidement que les lymphocytes B folliculaires (Martin et Kearney, 2000, Oliver et al., 1997). Cependant, les lymphocytes B de la zone marginale joue un rôle primordial dans la réponse aux antigènes T-indépendants de type II. Dans les souris *pyk2<sup>-/-</sup>*, déficiente en cellules B de la zone marginale, la réponse au ficoll, un antigène T-indépendant de type II, est diminuée (Guinamard et al., 2000). Comme ces souris ont un

nombre normal de lymphocytes B-1, les lymphocytes B de la zone marginale jouent probablement un rôle important dans la réponse aux antigènes T-indépendants de type II (Guinamard et al., 2000). Les lymphocytes B1 produisent de grandes quantités d'IgM sans stimulation antigénique, ils ont donc un rôle dans l'immunité naturelle (Askenase et al., 1999). De plus, les lymphocytes B1 migrent dans l'intestin (Kroese et la., 1989) et sont responsables de la production des IgA nécessaire à l'immunité contre les constituants de la paroi bactérienne (Macpherson et al., 2000). Toutes ces caractéristiques montrent des rôles particuliers pour les différentes populations de lymphocytes B.

## **1.3 APOPTOSE**

### **1.3.1 Caractéristiques générales de l'apoptose**

L'apoptose, ou la mort cellulaire programmée, est un processus par lequel une cellule est éliminée suite à un signal externe ou interne (White, 1996). L'apoptose joue un rôle primordial dans de nombreux événements biologiques incluant, le maintien de l'homéostasie (Raff et al., 1992). L'apoptose est très importante dans la régulation et le maintien de l'homéostasie des lymphocytes B et T (Veis et al., 1993). Les lymphocytes B reconnus comme pouvant réagir aux antigènes du soi ou victime d'un

mauvais réarrangement de leurs gènes sont éliminés par apoptose (Nemazee et Burki, 1989).

### **1.3.2 Mécanisme générale de l'apoptose**

La cascade d'événements menant à l'apoptose est variée mais le résultat est sensiblement le même soit la fragmentation de l'ADN, une condensation de la chromatine et la formation de corps apoptotiques (Kerr et al., 1972).

L'initiation de l'apoptose se fait suite à un signal externe qui peut être la liaison de ligands avec des récepteurs de la mort (Fas et TNFR) (Evan et Littlewood, 1998) ou un signal interne qui peut être des dommages à l'ADN (Sarasin et Stacy, 1997) . Ces deux signaux activeront des caspases initiatrices soit la caspase-8 pour les récepteurs de la mort (Muzio et al., 1998) et la caspase-9 pour les signaux internes (Li et al., 1997). Ces caspases initiatrices activeront des caspases effectrices (caspases-3, -6, -7) (Crims et Yuan, 1998). Les caspases effectrices couperont par la suite de nombreuses protéines nécessaire à la survie des cellules (Thornberry et Lazebnik, 1998).

Les caspases sont donc importantes dans l'apoptose puisqu'elles sont responsables de la majorité des événements menant à la mort cellulaire.

### **1.3.3 Les membres de la famille Bcl-2**

Une autre famille de protéines jouant un rôle prépondérant dans l'apoptose est la famille Bcl-2. Cette famille est composée de membres que l'on regroupe en anti-apoptotique et en pro-apoptotique (Tsujimoto et al., 1998). Les membres de la famille anti-apoptotique, dont fait partie Bcl-2, possèdent tous quatre domaines d'homologies à Bcl-2 (BH1 à BH4) bien conservés (Boise et al., 1993). On retrouve en plus de Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w et Mcl-1. En ce qui concerne les membres pro-apoptotiques, on peut séparer ces derniers en deux groupes selon les domaines BH qu'ils possèdent. Le premier groupe contient les domaines BH1 à BH3, dans ce groupe on retrouve entre autres les protéines Bax, Bak et Bok. Le deuxième groupe est composé de protéines qui n'ont que le domaine BH3, on retrouve dans cette sous-famille les protéines Bik, Bid, Bad et quelques autres membres (Adams et Cory, 1998).

### **1.3.4 Mécanismes d'action de Bcl-2**

La molécule Bcl-2 joue plusieurs rôles dans l'inhibition de l'apoptose. Un de ces rôles est d'empêcher le relargage du cytochrome C de la membrane mitochondriale (Yang et al., 1997). Un autre moyen par lequel Bcl-2 peut empêcher l'apoptose est par sa liaison avec la molécule Apaf-1 qui forme, avec le cytochrome C et la pro-caspase-9, un complexe qui va libérer la caspase-9 active (Hu et al., 1998). Il a également été montré que la molécule Bcl-2 peut se lier à des membres pro-apoptotique, ces liaisons auront différentes conséquences. L'homodimérisation de Bcl-2 lui confère son rôle de protecteur contre l'apoptose (Oltvai et al., 1993). L'interaction peut aussi être entre Bcl-2 et différentes protéines pro-apoptotiques. L'interaction entre Bcl-2 et les membres de la famille pro-apoptotique qui contient les domaines BH1 à BH3, cette interaction résultera en une inhibition du rôle pro-apoptotique des membres de la sous-famille de Bax (Oltvai et al., 1993). Une autre interaction est celle entre Bcl-2 et Bad, cette interaction contrairement à la précédente inhibe l'activité anti-apoptotique de Bcl-2 et entraîne l'apoptose (Blume-Jensen et al., 1998).

Les souris Bcl-2 déficientes dans l'expression du gène qui code pour Bcl-2 ont un développement normal et ce n'est que plus tard que l'on observe une apoptose excessive des cellules lymphoïdes, des lésions au niveau des cellules neuronales et intestinales et une maladie rénale qui



s'avère fatale (Veis et al., 1995). Dans les souris surexprimant Bcl-2 dans les lymphocytes B, il y a une hyperplasie lymphoïde caractérisée par une expansion des follicules. L'augmentation de Bcl-2 prolonge également la survie des lymphocytes B matures ce qui expliquent l'expansion des follicules (McDonnell et al., 1996).

Les membres de la famille Bcl-2 jouent donc un rôle primordial dans la régulation du processus apoptotique. Ce processus joue un rôle primordial dans l'élimination des lymphocytes B autoréactives (Nemazee et Burki, 1989).

## **Buts du projet de recherche**

Des études, faites sur les souris exprimant un transgène de la molécule B7.2 sur les lymphocytes B, ont montré qu'il y avait une élimination des lymphocytes B (Fournier et al., 1997, Van Parijs et al., 1997). Cette élimination se fait par l'entremise des lymphocytes T et par l'intermédiaire de la molécule CD28 (Fournier et al., 1997). Cette élimination est indépendante du récepteur de la mort Fas. En effet, des souris B7.2 transgéniques déficientes dans l'expression de la molécule Fas ont également une diminution de leur nombre de lymphocytes B (Fournier et al., 1997).

La présente étude tente de déterminer si l'élimination des lymphocytes B peut être inhibée dans les souris B7.2 transgéniques dans lesquelles, un transgène de Bcl-2 est exprimé dans les lymphocytes B. De plus, cette étude tente également de caractériser phénotypement et fonctionnellement les lymphocytes B résistants à cette élimination. Cette étude montrera que l'élimination se fait par apoptose. De plus, elle tentera de montrer que l'expression de la molécule B7.2 sur les lymphocytes B ne joue pas le même rôle dans l'homéostasie des différentes populations de lymphocytes B.

## **MATÉRIEL et MÉTHODES**

### **2.1 Différentes souris utilisées**

Le transgène des souris B7.2 tg contient le cDNA de B7.2 qui est sous le contrôle du promoteur H2K<sup>b</sup> et de l'enhancer de l'immunoglobuline. La présence du transgène dans les souris est déterminée en marquant les lymphocytes périphériques avec un anticorps anti-B7.2. Les souris B7.2/Bcl-2 sont produites en accouplant des souris B7.2 tg avec des souris exprimant un transgène Bcl-2 humain dans leur lymphocyte B (E $\mu$ -bcl-2-33 (Strasser et al., 1991)). Les souris Bcl-2 ont été achetées des laboratoires Jackson (Bar Harbor, ME).

### **2.2 Isolation des cellules de la moelle osseuse**

Chacune des étapes s'effectue à 4°C. Couper une patte de souris au niveau de la hanche, du genou et de la cheville. Enlever le muscle entourant les os à l'aide de ciseaux. Insérer d'une seringue contenant du milieu RPMI dans l'os (RPMI, 2g NaHCO<sub>3</sub>/L, 10% sérum de veau foetal, pénicilline, streptomycine,  $\beta$ -mercaptoéthanol)( Gibco BRL, Grand Island, NY) puis, faire sortir la moelle osseuse dans un pétris (Becton Dickinson

Labware, Franklin Lakes, NJ). Défaire la moelle osseuse en l'aspirant 2 à 3X dans la seringue. Filtrer les cellules et rincer le pétris avec 5 mL de milieu RPMI. Centrifuger les cellules pour 5 min., à 4°C à 1600 rpm et aspirer le milieu avant de resuspendre les cellules dans 5 mL de solution ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15M,  $\text{KHCO}_3$  1mM,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  0.1 mM). Aspirer le surnageant puis resuspendre les cellules dans 5 mL de milieu RPMI et centrifuger. Refaire cette étape. Finalement, resuspendre les cellules dans 5 mL de milieu RPMI et filtrer ces dernières avant d'effectuer le compte final. Les comptes sont effectués avec un hémacytomètre. Finalement, marquer les cellules de la façon désirée.

### **2.3 Isolation des cellules de la rate**

Chacune des étapes se fait à 4°C. Prélever la rate et déposer cette dernière dans un pétris contenant 5 mL de milieu RPMI. Couper ensuite la rate en morceaux et récupérer les cellules, en écrasant les morceaux dans un tamis à l'aide d'un pilon, dans le pétris contenant 5 mL de milieu RPMI. Rincer le tamis avec 3 mL de milieu puis dissocier les cellules en les resuspendant à plusieurs reprises. Filtrer les cellules et rincer le pétris avec 5 mL de milieu RPMI. Centrifuger les cellules 5 min., à 4°C à 1600 rpm et aspirer le milieu avant d'effectuer la lyse des globules rouges avec la solution ACK ( $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.15M,  $\text{KHCO}_3$  1mM,  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$  0.1mM). Centrifuger

les cellules 5 min., à 4°C à 1600rpm, aspirer le surnageant et resuspendre dans 5 mL de milieu RPMI. Refaire cette étape à une autre occasion. Resuspendre les cellules dans 10 mL de milieu RPMI et filtrer ces dernières avant de compter les cellules avec un hémacytomètre; par la suite, marquer de la façon désirée.

## **2.4 Isolation des cellules des ganglions**

Prélever les ganglions brachiaux (2), les ganglions axillaires (2) et les ganglions inguinales (2). Les étapes s'effectuent à 4°C. Dissocier les cellules en coinçant ces dernières entre deux lames givrées imbibées de milieu. Rincer les lames avec 3 mL de milieu RPMI puis, dissocier les cellules en les resuspendant à plusieurs reprises. Filtrer les cellules et laver le pétris avec 5 mL de milieu. Centrifuger pendant 5 min., à 4°C à 1600 rpm et aspirer le surnageant. Resuspendre les cellules dans 5 mL de milieu, puis centrifuger à nouveau. Resuspendre les cellules dans 4 mL de milieu et filtrer. Compter les cellules à l'aide d'unhémacytomètre pour ensuite faire les marquages appropriés.

## **2.5 Isolation des lymphocytes du sang**

Le sang est prélevé de la queue d'une souris chauffée avec une ampoule. Faire une incision dans la queue de la souris avec une lame de rasoir et récupérer 4 à 5 gouttes de sang dans un tube à FACS (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ) contenant 1mL de la solution d'Alservier (114 mM de dextrose, 27 mM de Na citrate, 71 mM de NaCl). Après avoir vortexé, déposer 3 mL de ficoll (Amersham Pharmacia Biotech, AB) à l'aide d'une seringue. Centrifuger 20 min. à la température de la pièce à 1600 rpm puis, transférer les anneaux de lymphocytes dans les tubes à FACS contenant 3 mL d'une solution facs de 1% de sérum de veau foetal dans du PBS1X 0.1% NaN<sub>3</sub> (PBS: Phosphate Buffer Saline, PBS25X: 67 mM de KCl, 0.2 M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 36.7 mM de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> et 3.9M de NaCl). Après avoir centrifugé 5 min., à 4°C à 2000 rpm, jeter le surnageant et vortexer les tubes avant l'ajout de 1 mL du tampon de lyse des globules rouges (90 mL de NH<sub>4</sub>Cl 0.16 M, 10 mL de TRIS 0.17 M ph 7.65; ajuster à pH 7.2). Centrifuger comme précédemment puis éliminer le surnageant et laver les cellules avec 3 mL de la solution FACS puis, centrifuger. Éliminer finalement le surnageant et marquer les cellules avec les anticorps appropriés.

## **2.6 Isolation des lymphocytes B-1**

Les cellules B-1 sont isolées de la cavité péritoniale des souris. Une petite ouverture est effectuée dans la membrane péritoniale et les cellules sont récupérées en injectant, à l'aide d'une pipette de 10 mL, 2 à 3 mL de milieu RPMI. L'étape est répétée à plusieurs reprises. Les cellules sont centrifugées pendant 5 min., à 4°C à 1600 rpm. Le surnageant est aspiré et les cellules sont resuspendues dans 5 mL de milieu RPMI. Répéter cette étape à deux autres occasions. Resuspendre les cellules dans 1 mL de milieu et compter les cellules avec un hémacytomètre. Marquer les cellules avec les anticorps appropriés.

## **2.7 Marquage des cellules pour étude en cytométrie de flux**

Pour les marquages des cellules isolées des organes lymphoïdes (rate, ganglions et moelle osseuse), mettre 1 million de cellules dans les tubes FACS. Pour le sang, prendre toutes les cellules récupérées. Mettre 3 mL de solution FACS (1% de sérum de veau foetal dans du PBS1X 0.1% NaN<sub>3</sub>) avec les cellules, puis centrifuger pour 5 min., à 4°C à 1600 rpm. Aspirer ensuite le surnageant et mettre 50µL de 2.4G2 (anticorps de rat contre les récepteurs FC de souris). Incuber à 4°C 15 min., puis mettre les anticorps primaires (biotinylés). Incuber 25 min. à 4°C, puis mettre 3 mL de

solution FACS et centrifuger. Jeter le surnageant, bien vortexer avant d'ajouter les anticorps fluorescents (FITC, PE) ou la streptavidine fluorescente (SA-FITC, SA-PE, SA-TC et SA-CyC). Incuber 25 min. à 4°C puis laver une fois en présence de solutions FACS et ensuite dans le PBS- $\text{NaN}_3$  (PBS1X-0.1%  $\text{NaN}_3$ ). Les tubes sont lus avec un cytomètre de flux (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les lymphocytes (10000) sont acquis et analysés à l'aide du programme CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA).

## **2.8 Marquages**

Les marqueurs utilisés sont les suivants: Annexin-V FITC (Pharmingen, Mississauga, ON), anti-B220-FITC et PE (Clone RA3-6B2, Gibco BRL (FITC, Grand Island, NY, Cedarlane Laboratories (PE), Hornby, ON), anti-IgM-biotine (clon II-41, Pharmingen, Mississauga, ON), anti-CD43-FITC (clone 57, Pharmingen, Mississauga, ON), anti-HSA-FITC (clone M1/79, Pharmingen, Mississauga, ON), anti-IgD-FITC (clone 11-26C.2A, Pharmingen, Mississauga, ON), anti-IgD-biotine (clone Igh-5b, Pharmingen, Mississauga, ON), anti-CD21-FITC (clone 7G6, Pharmingen, Mississauga, ON), anti-CD62-L-biotine (clone MEL-14, Cedarlane Laboratories, Hornby, ON), anti-CD1-biotine (clone 1B1, Pharmingen, Mississauga, ON), anti-CD38-biotine (clone 90, Pharmingen, Mississauga, ON), anti-B7.2 FITC



(Préparé dans le laboratoire à partir du clon GL1), anti-B7.2-PE (clone RMMP-1, Cedarlane Laboratories, Hornby, ON), Streptavidine-FITC (SA-FITC), SA-PE, SA-TC (Caltag Laboratories, Hornby, ON) et Sa-CyC (Pharmingen, Mississauga, ON).

## **2.9 Isolation des lymphocytes B à l'aide d'une colonne magnétique**

Les manipulations sont effectuées de façon stérile. Isoler les cellules de la rate comme décrit dans la section 2.3. Laver les cellules 1 fois dans 5 mL de PBS/0.5% BSA, puis resuspendre dans 90 $\mu$ L de PBS/BSA 0.5% pour 10 millions de cellules. Ajouter 10 $\mu$ L de billes anti-CD43 (Miltenyi Biotec, Auburn, CA) pour 10 millions de cellules et incuber 15 min. à 4°C au frigo. Préparer la colonne vario macs selon le protocole du fabricant (Miltenyi Biotec, Auburn, CA). Après l'incubation des cellules, ajouter 10mL de PBS/BSA 0.5% et centrifuger 5 min., à 4°C à 1600 rpm. Resuspendre les cellules dans 1 mL de PBS/BSA 0.5% pour 100 millions de cellules. Déposer la suspension sur la colonne et rincer le tube avec 1mL de PBS/BSA 0.5%. Recueillir la suspension dans un tube de 50 mL. Laver ensuite la colonne avec 15 mL de PBS/BSA 0.5% et recueillir dans le même tube. Centrifuger avant de resuspendre les cellules dans 5 mL de milieu et prendre un aliquot pour compter les cellules. Marquer les cellules avec les anticorps désirés.

## **2.10 Séparation des lymphocytes B MZ et folliculaires de la rate**

Après avoir isolé les lymphocytes selon la méthode décrite dans la section 2.8, resuspendre les cellules dans 5 mL de PBS puis centrifuger 5 min. à 4°C à 1600 rpm. Resuspendre les cellules à une concentration de 18 millions de cellules/mL dans des tubes falcon 12 X 75 (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Centrifuger et resuspendre les cellules dans 100 µL de PBS/2% Sérum de Veau Foetale (SVF). Incuber les cellules sur la glace pendant 25 min. avec différentes combinaisons de marqueurs (section 2.8). Laver les cellules avec du PBS puis avec du PBS 2% SVF avant de les filtrer à travers une mèche ayant des mailles de 100µM. Passer les cellules au trieur FACS Vantage; l'analyse est effectuée avec le programme CellQuest (Becton Dickinson, San Jose, CA). Les cellules triées sont récupérées dans des tubes (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ), contenant 1 mL de milieu de culture-20% SVF dont les parois sont humectées suite à une légère agitation au vortex (préparer ces tubes 24 heures à l'avance). Les tubes contenant la même population de cellules sont centrifugés et les cellules sont regroupées dans un même tube. Après centrifugation, les cellules sont resuspendues dans un volume minimal et les comptes cellulaires sont effectués. Les cellules peuvent être mises en culture pour tester la prolifération.

### **2.11 Essais de prolifération des lymphocytes B au LPS**

Après la séparation des populations de cellules au trieur, centrifuger les cellules et resuspendre dans du RPMI pour obtenir une concentration de  $0.75 \times 10^6$  cellules/mL. Distribuer ensuite 100 000 cellules/puits (135  $\mu$ L) dans une plaque à 96 puits (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ). Mettre ensuite la concentration voulue de LPS (Sigma, St-Louis, MO) et incuber les cellules à 37°C pendant 48 ou 72 heures. Environ 6 heures avant la lecture des plaques, ajouter 10  $\mu$ L d'une concentration de 0.1mCi de tritium ( $H^3$ ) (NEN, Boston, MA) dans chacun des puits. Remettre la plaque à 37°C. Récupérer les cellules des puits à l'aide d'un Cell Harvester. Les cellules sont récupérées sur des filtres Whatman GF/C (VWR, South Plainfield, NJ). La prolifération dans chacun des puits est mesurée en comptant la radioactivité à l'aide d'un compteur  $\beta$ .

### **2.12 ELISA des immunoglobulines de souris**

Les plaques pour ELISA (Costar, Cambridge, MA) sont recouvertes avec 100  $\mu$ L d'anticorps de chèvre anti-immunoglobulines de souris (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) pour la nuit à 4°C. Les plaques sont lavées deux fois avec du PBS 0.05% Tween 20 (PBS/Tween) puis incubées 1 heure à la température de la pièce avec du PBS contenant 1% de

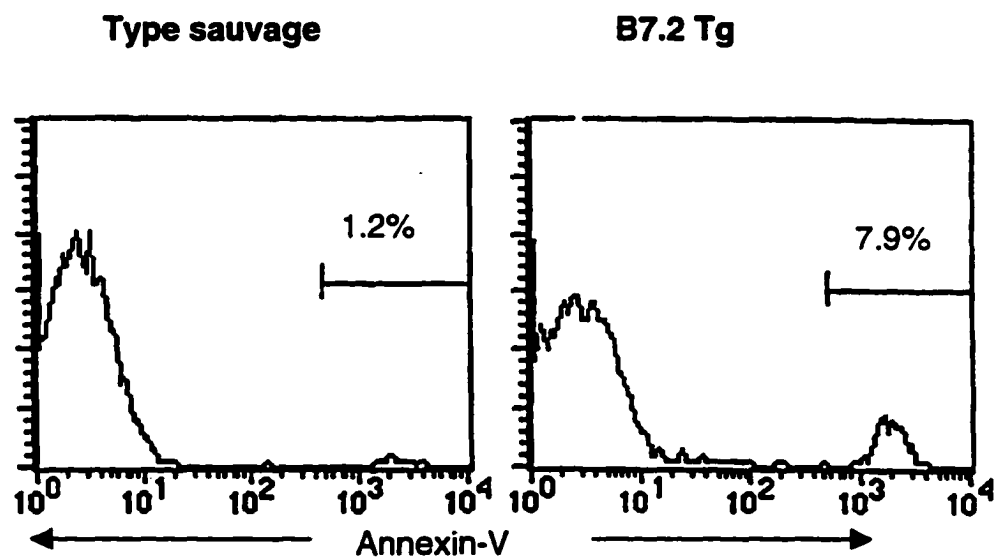
BSA (PBS/BSA) et lavées trois fois avec du PBS/Tween. Les sérums sont dilués dans du PBS/BSA; 100 µL sont déposés dans les puits en duplicata et incubés 3 heures à la température de la pièce. Les plaques sont lavées trois fois avec du PBS/Tween et incubées 1 heure avec des anticorps de chèvre contre les différents isotypes d'immunoglobulines de souris couplés à la peroxydase de raifort (5µg/mL dans du PBS contenant 1% de BSA et 0.05% de Tween-20, Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL). Finalement, trois lavages avec du PBS/Tween sont effectués. Par la suite, le substrat peroxydase 0.3mg/mL (Southern Biotechnology Associates, Birmingham, AL) est dilué dans 0.1M d'acide citrique (pH 4.3). Du peroxyde d'hydrogène 0.03% (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) est ensuite ajouté. La lecture des plaques se fait à 415 nm à l'aide d'un lecteur à microplaques (Biorad) respectivement, 10 min. et 20 min. après avoir ajouté le substrat.

## RÉSULTATS

### **3.1 L'élimination des lymphocytes B dans les souris B7.2 tg est inhibée par la molécule Bcl-2.**

Il a été préalablement montré que le nombre de lymphocytes B retrouvés dans la moelle osseuse des souris exprimants constitutivement la molécule B7.2 est grandement réduit (Fournier et al., 1997). Pour déterminer si cette élimination se fait via un mécanisme apoptotique, l'expression de phosphatidyl sérine par les lymphocytes B a été testée par un marquage à l'annexin-V. Ce marquage permet de déterminer l'entrée en apoptose des lymphocytes. L'incidence d'apoptose parmi les cellules B220<sup>+</sup> isolées de la moelle osseuse de souris B7.2 tg est légèrement plus élevée que ce qui est retrouvée dans les souris de type sauvage (Figure 3). Pour ce qui est des organes lymphoïdes secondaires, l'incidence est sensiblement la même entre les souris B7.2 tg et les souris de type sauvage (résultats non-présenté). L'absence d'un nombre élevé de cellules apoptotique est probablement due à l'élimination rapide *in vivo* des cellules apoptotiques (Hartley et al., 1993, Finkelman et al., 1995).

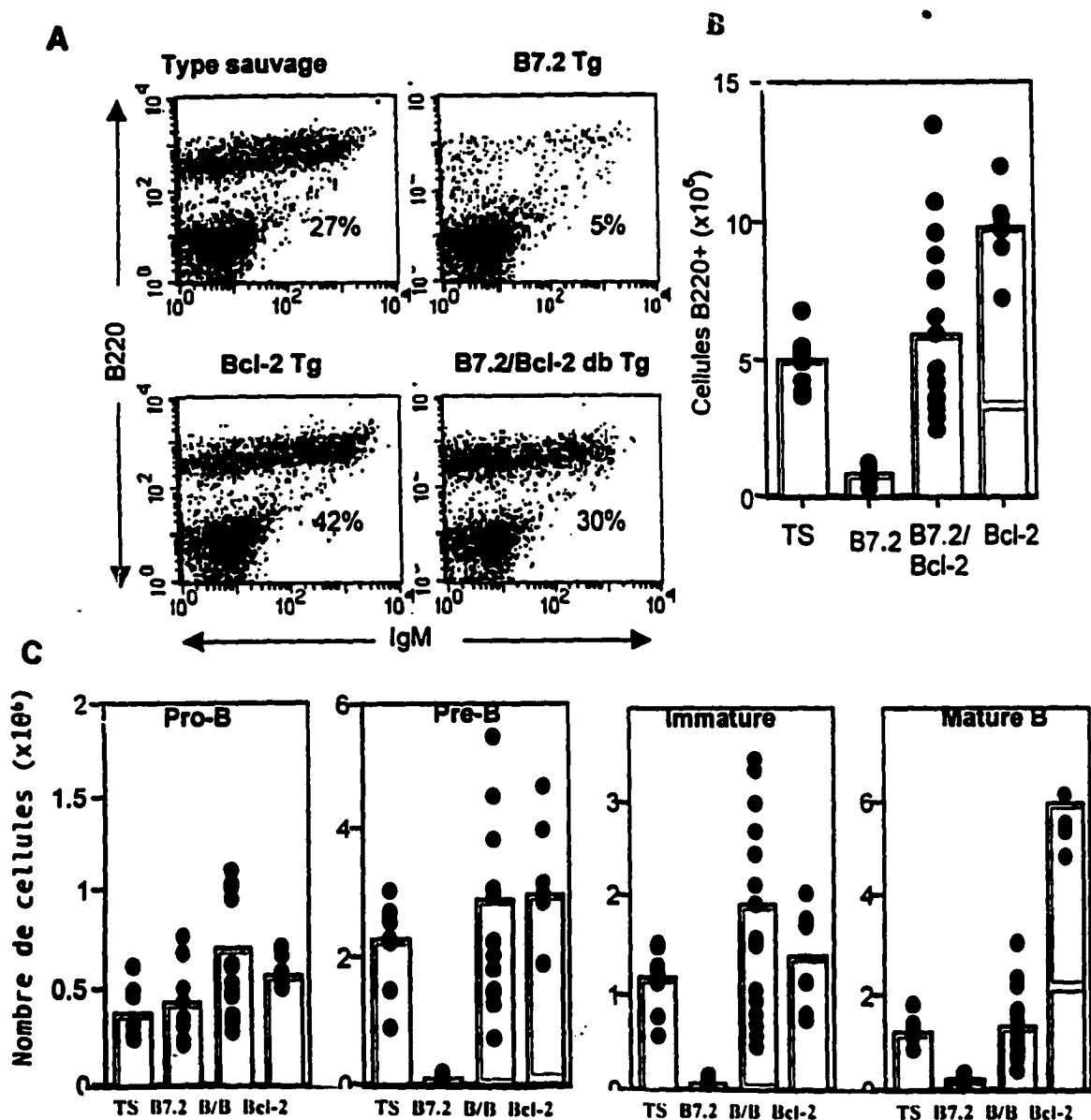
Pour déterminer le rôle de l'apoptose dans l'élimination des lymphocytes B des souris B7.2 tg, les souris B7.2 tg ont été accouplées avec des souris exprimants un transgène Bcl-2 humain dans leurs lymphocytes B



**FIGURE 3.** Analyse par cytométrie de flux de la liaison de l'annexin V à la membrane des lymphocytes B de la moelle osseuse de souris B7.2 tg et de type sauvage. Les nombres représentent le pourcentage de cellules B220<sup>+</sup> exprimant l'annexin V. Les résultats sont représentatifs de 3 expériences.

(E $\mu$ -bcl-2-22 (Strasser et al., 1991)). La figure 4A montre que la fréquence de cellules B220<sup>+</sup> est très faible dans les souris B7.2tg et que leur nombre est réduit à environ 15% de ce qui est observé dans les souris de type sauvage (Figure 4B). En comparaison des souris B7.2 tg, les souris B7.2/Bcl-2 double tg voient leur fréquence de lymphocytes B dans la moelle osseuse augmentée (Figure 4A). Le nombre de cellules B220<sup>+</sup> dans les souris B7.2/Bcl-2 double tg est augmenté de 4 à 18 fois comparativement aux souris B7.2tg. En moyenne, leurs nombres atteignent des valeurs similaires à ceux retrouvés dans les souris de type sauvage (Figure 4B). La très grande variabilité observée dans le nombre de lymphocytes B dans les souris B7.2/Bcl-2 double tg n'est pas unique à notre modèle. En effet, cette variabilité a été observée dans un autre modèle où il y a élimination des lymphocytes B (HEL-Ig/mHEL tg). Les nombres absolus de lymphocytes B de certaines souris B7.2/Bcl-2 double tg sont semblables aux nombres des souris Bcl-2 tg (Figure 4B).

L'expression de certains marqueurs de surfaces (B220, CD43, IgM et HSA) permet de caractériser les populations de lymphocytes B sauver par l'expression constitutive de Bcl-2 dans les lymphocytes B. Les cellules pré-B, immatures ou matures sont pratiquement absentes de la moelle osseuse des souris B7.2 tg (Figure 4C). Le nombre de lymphocytes pro-B est semblable dans les souris B7.2 tg et les souris de type sauvage (Figure 4C). Contrairement à ce qui est observé dans les souris B7.2tg, les cellules



**FIGURE 4.** L'expression de Bcl-2 dans les lymphocytes B des souris B7.2 tg empêche l'élimination des lymphocytes B de la moelle osseuse. Les cellules ont été marquées avec des anticorps (Ac) contre le B220, l'IgM, le H.S.A, le CD43 puis analysé par cytométrie de flux. **A**, profil du marquage B220 versus IgM. Les valeurs représentent les pourcentages de cellules B220<sup>+</sup>. **B**, nombre absolu de cellules B220<sup>+</sup> provenant d'un tibia et d'un fémur. Chacun des points correspond à une expérience et les colonnes représentent la moyenne. **C**, nombre absolu des différentes sous-populations de cellules B de la moelle osseuse. Les populations sont divisées comme suit: pro-B (B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>CD43<sup>+</sup>), pré-B (B220<sup>+</sup>IgM<sup>-</sup>CD43<sup>-</sup>), immature (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>H.S.A<sup>élevé</sup>) et mature (B220<sup>+</sup>IgM<sup>+</sup>H.S.A<sup>faible</sup>).



B220<sup>+</sup> exprimants des marqueurs de surfaces caractéristiques des cellules pré-B, immatures ou matures reviennent à des nombres équivalents ou légèrement plus élevés dans les souris B7.2/Bcl-2 double tg comparativement aux nombres retrouvés dans les souris de type sauvage (Figure 4C). Les souris Bcl-2 tg ont des nombres normaux de cellules pro-B, pré-B et immatures, mais des nombres plus élevés de cellules matures (Figure 4C). Cet effet a été observé dans des études préalables (McDonnell et al., 1989).

Ces résultats montrent que l'expression constitutive de la molécule Bcl-2 redonne une distribution et des nombres normaux de lymphocytes B dans les souris B7.2 tg. Donc, l'élimination des cellules B de la moelle osseuse des souris B7.2 tg par les lymphocytes T se fait par une voie pouvant être inhibée par la molécule Bcl-2.

### **3.2 L'expression de Bcl-2 provoque une augmentation de cellules B immature dans les organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2tg.**

Il a été précédemment montré que les souris B7.2 tg ont des nombres diminués de lymphocytes B dans leurs organes lymphoïdes secondaires (Fournier et al., 1997). Le nombre absolu de lymphocytes B dans les

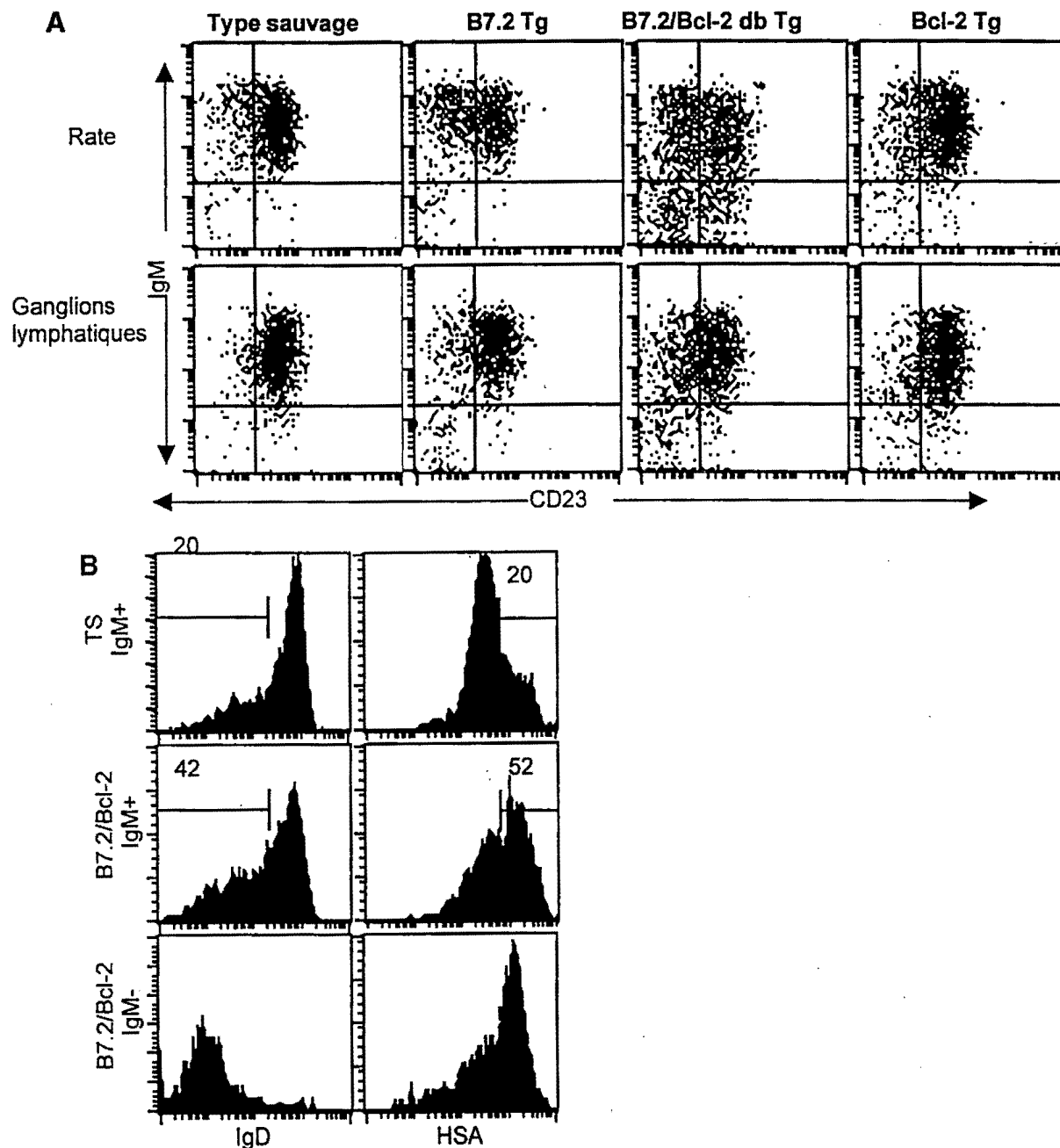
ganglions lymphatiques des souris B7.2 tg est environ 24% du nombre contenu dans les ganglions lymphatiques des souris de type sauvage alors qu'il est d'environ 50% dans la rate des souris de type sauvage (Tableau I). L'expression de Bcl-2 dans les lymphocytes B augmente le nombre de cellules B dans les organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2 tg. Dans les souris B7.2/Bcl-2 double tg, le nombre de cellules B220<sup>+</sup> est augmenté de 6 à 10 fois dans la rate et les ganglions lymphatiques. Même si les nombres retrouvés dans les souris B7.2/Bcl-2 double tg sont variables, ils sont plus élevés que ceux des souris B7.2tg.

Une analyse par cytométrie de flux de l'expression du B220, du CD23 et de l'IgM a permis de montrer que les populations cellulaires des organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2/Bcl-2 sont différentes de celles retrouvées dans les souris de type sauvage, Bcl-2 ou B7.2 tg (Figure 5A). La majorité des lymphocytes B sont IgM<sup>+</sup> et CD23<sup>+</sup> dans les souris de type sauvage ou Bcl-2 tg. Les cellules IgM<sup>+</sup> exprimants peu ou pas le CD23 représentent 15% des lymphocytes B de la rate mais, ces cellules sont partiellement absentes des ganglions lymphatiques (Tableau I). Dans les souris B7.2/Bcl-2 double tg, la proportion de cellules IgM<sup>+</sup>CD23<sup>-</sup>, dans la rate et les ganglions lymphatiques, est augmentée suggérant une accumulation de cellules B immatures. En accord avec cette observation, la fréquence de cellules IgM<sup>+</sup>, exprimants faiblement l'IgD ou de façon élevée le H.S.A., est doublée dans la rate des souris B7.2/Bcl-2 double tg (Figure 5B). La

Tableau I. Sous-population de lymphocytes B de la rate et des ganglions lymphatiques de souris transgéniques B7.2, B7.2/Bcl-2, Bcl-2 et des souris de type sauvage.

Group	n	Rate				Ganglions lymphatiques			
		B220+	IgM+ CD23+	IgM+ CD23-	IgM-	B220+	IgM+ CD23+	IgM+ CD23-	IgM-
Type sauvage	7	58 ± 16	45 ± 13	10 ± 3	3 ± 1	7.1 ± 1.2	6.5 ± 0.8	0.4 ± 0.1	0.1 ± 0.1
B7.2	5	26 ± 6	9 ± 3	15 ± 3	2 ± 0	1.7 ± 0.7	1.2 ± 0.7	0.2 ± 0.1	0.2 ± 0.1
B7.2/Bcl-2	12	146 ± 61	59 ± 29	49 ± 21	38 ± 18	17.9 ± 9.0	10.5 ± 6.6	3.8 ± 2.3	2.9 ± 1.5
Bcl-2	5	161 ± 29	120 ± 25	29 ± 10	12 ± 2	13.8 ± 4.7	12.6 ± 3.1	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.3

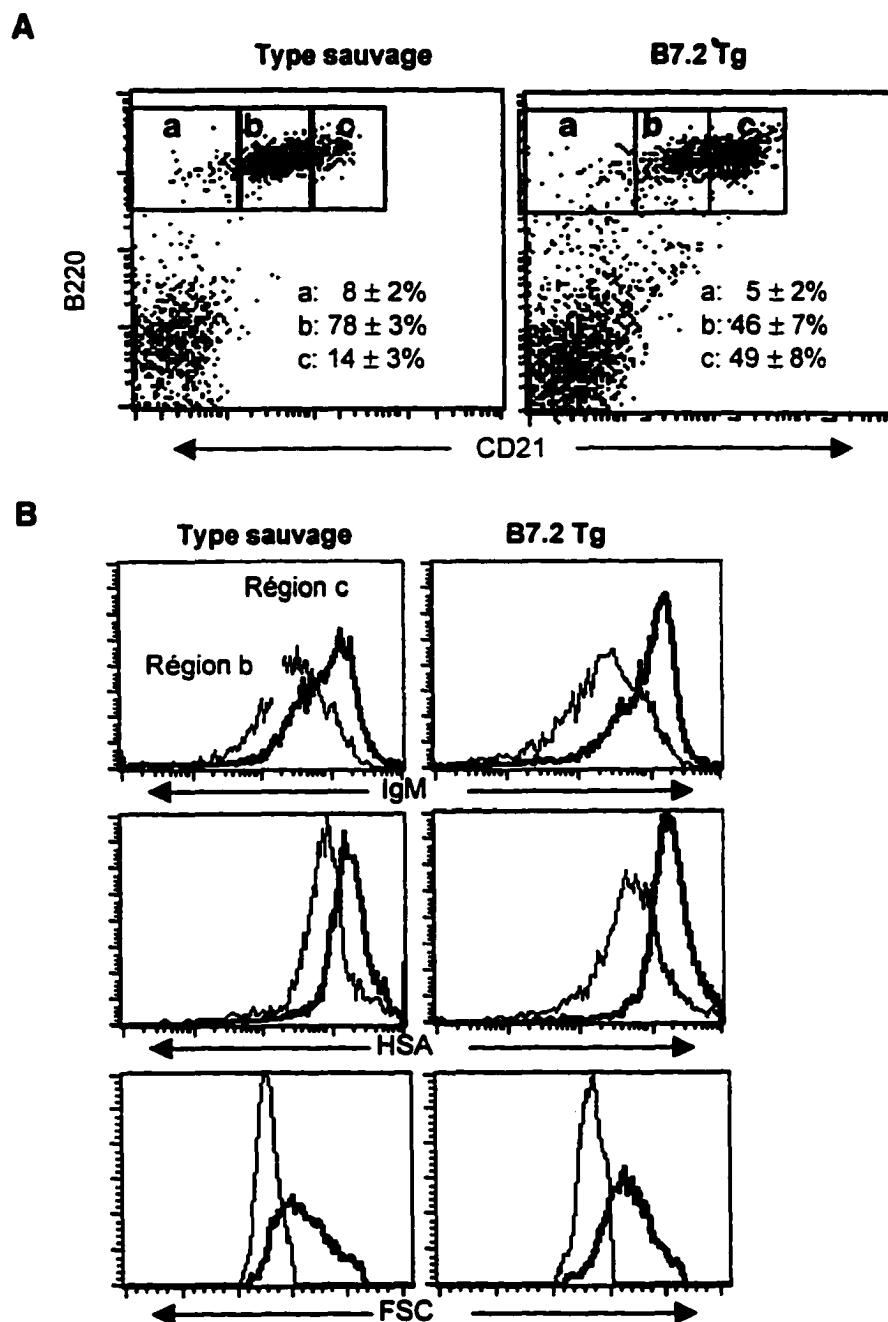
Les résultats ont été obtenus par analyse en cytométrie de flux trois couleurs des cellules marquées avec un Ac anti-B220 FITC, un Ac anti-CD23 PE et une anti-IgM biotynilé + SATC. Les valeurs représentent la moyenne ± déviation standard et sont exprimées en millions de cellules.



**FIGURE 5.** Apparition de cellules b immatures dans les organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2/Bcl-2 double tg. Les cellules des ganglions lymphatiques et/ou de la rate ont été marquées avec des anticorps contre le B220, l'IgM et soit le CD23, l'IgD ou le H.S.A. Par la suite, l'analyse par cytométrie de flux des différents marquages a été effectuée. **A**, l'expression de l'IgM versus le CD23 sur les cellules B220+ de la rate et des ganglions lymphatiques. **B**, expression de l'IgD et du H.S.A. par les cellules B220+IgM+ des souris de type sauvage (haut), des souris B7.2/Bcl-2 double tg (milieu) et sur les cellules B220+IgM- des souris B7.2/Bcl-2 double tg (bas). Les résultats montrent une expérience représentative (Tableau I donne le nombre de souris utilisées de chaque type).

fréquence de cellules  $\text{IgM}^+\text{CD23}^-$  est également augmentée dans les souris B7.2 tg en comparant avec les souris de type sauvage et les souris Bcl-2tg (Figure 5A). Cependant, l'augmentation est relative et est attribuable à la diminution dans le nombre absolu de cellules  $\text{IgM}^+\text{CD23}^+$  (Tableau I). Cette population est différente de la population  $\text{IgM}^+\text{CD23}^-$  augmentée dans la rate et les ganglions lymphatiques des souris B7.2/Bcl-2 double tg. Dans les souris B7.2/Bcl-2 double tg, l'expression de l'IgM est variable (Figure 5A) et le CD21 est exprimé faiblement (résultats non-présentés). Les cellules  $\text{IgM}^+\text{CD23}^-$  dans la rate des souris B7.2 tg expriment l'IgM de façon élevée (Figure 5A) et des niveaux élevés de CD21 (Figure 6A). Une autre particularité des cellules B de souris B7.2/Bcl-2 double tg est l'augmentation du nombre absolu de cellules  $\text{B220}^+\text{IgM}^-$  dans la rate et les ganglions lymphatiques en comparaison avec les souris de type sauvage ou Bcl-2 (Tableau I et Figure 5). Ces cellules  $\text{IgM}^-$  n'expriment pas le CD23 et l'IgD, mais expriment fortement le H.S.A. ce qui est représentatif des cellules immatures.

Le nombre absolu de cellules matures ( $\text{IgM}^+\text{CD23}^+$ ) est augmentée significativement dans la rate et les ganglions lymphatiques des souris B7.2/Bcl-2 double transgéniques lorsque comparé aux nombres dans les souris B7.2 tg (Tableau I). Donc, l'expression de Bcl-2 dans les souris B7.2 tg augmente significativement le nombre de cellules B matures et permet aux cellules B immatures de se retrouver dans les organes lymphoïdes secondaires.



**FIGURE 6.** Augmentation des cellules B exprimant le CD21 de façon élevée dans la rate des souris B7.2tg. Les cellules sont marquées avec de l'Ac contre le B220, le CD21 et l'IgM ou le H.S.A. **A**, l'expression du B220 vs le CD21 par les cellules lymphocytaires. Les nombres correspondent à la fréquence de cellules CD21 parmi les cellules B220<sup>+</sup> (moyenne  $\pm$  déviation standard; n=17). **B**, les cellules de la rate B220<sup>+</sup>CD21<sup>intermédiaire</sup> (région b de 5A) ou B220<sup>+</sup>CD21<sup>élevé</sup> (région c de 5A) ont été sélectionnées et analysées pour leur expression de l'IgM ou du H.S.A. et pour leur taille (FSC)

### **3.3 Augmentation du nombre de cellules CD21<sup>élevé</sup> dans la rate des souris B7.2 tg.**

La découverte que les souris B7.2 tg avaient une fréquence élevée de cellules qui expriment des niveaux élevés d'IgM (Figure 5A), suggère que l'élimination des lymphocytes B par les lymphocytes T modifie le ratio des cellules B périphériques. Pour identifier les populations de lymphocytes B, nous avons utilisé le marqueur de surface CD21 sur les cellules de la rate des souris B7.2 tg et de type sauvage. Le CD21 (ou récepteur 2 du complément (CR2)) a été identifié comme étant le récepteur pour le fragment 3 du complément (iC3b, C3d,g et C3d) (Tedder et al., 1997). Ce marqueur est exprimé par les lymphocytes B matures. Les lymphocytes B folliculaires expriment des niveaux modérés de CD21 alors qu'une autre population de lymphocytes B matures expriment des niveaux élevés de CD21 (Oliver et al., 1997). Comme il est montré à la figure 4, la majorité des lymphocytes B dans la rate de souris contrôle exprime le CD21 modérément (CD21<sup>int</sup>), caractéristique des lymphocytes B folliculaires. Une faible proportion de lymphocytes B ( $8 \pm 2\%$ ;  $n=16$ ) est négative pour le CD21 (CD21<sup>-</sup>). Les cellules de la rate n'exprimant pas le CD21 sont des cellules immigrants de la moelle osseuse (Loder et al., 1999). Une autre population exprime des niveaux élevés de CD21 (CD21<sup>élevé</sup>). Dans les souris B7.2 tg, la fréquence de cellules CD21<sup>int</sup> est diminuée comparativement à la fréquence dans les souris de type sauvage ( $78 \pm 3\%$  vs  $46 \pm 7\%$ , respectivement pour les souris

TS et B7.2 tg; n=16). Les lymphocytes B CD21<sup>élevé</sup> représentent environ 50% des lymphocytes B de la rate des souris B7.2tg ( $14 \pm 3\%$  vs  $49 \pm 7\%$ , respectivement pour les souris TS et B7.2 tg; n=16). Un résumé des nombres absolus des sous-populations des cellules de la rate est présenté dans le tableau II. Comparativement aux souris contrôles, les nombres de cellules CD21<sup>+</sup> et de CD21<sup>int</sup> étaient diminués d'environ 70% dans les souris B7.2 tg. Dans les souris B7.2 tg, les nombres de cellules CD21<sup>élevé</sup> étaient légèrement supérieurs. Les lymphocytes B CD21<sup>élevé</sup> se retrouvent uniquement dans la rate et ne sont pas présents dans les ganglions lymphatiques ni dans le sang (résultats non-présentés). Ces résultats montrent que l'élimination des lymphocytes B par les lymphocytes T ciblent principalement les lymphocytes B nouvellement formés et les lymphocytes B folliculaires mais n'affecte pas les lymphocytes CD21<sup>élevé</sup>.

### **3.4 La majorité des cellules CD21<sup>élevé</sup> des souris B7.2 tg ont les caractéristiques phénotypiques des lymphocytes B de la zone marginale.**

Pour caractériser ces lymphocytes B CD21<sup>élevé</sup>, nous avons marqués les cellules de la rate avec des anticorps contre le B220, le CD21 et soit l'IgM ou le H.S.A.. Comme le montre la figure 6B, les cellules CD21<sup>élevé</sup> B220<sup>+</sup> étaient plus grosse et expriment des niveaux plus élevés d'IgM et de

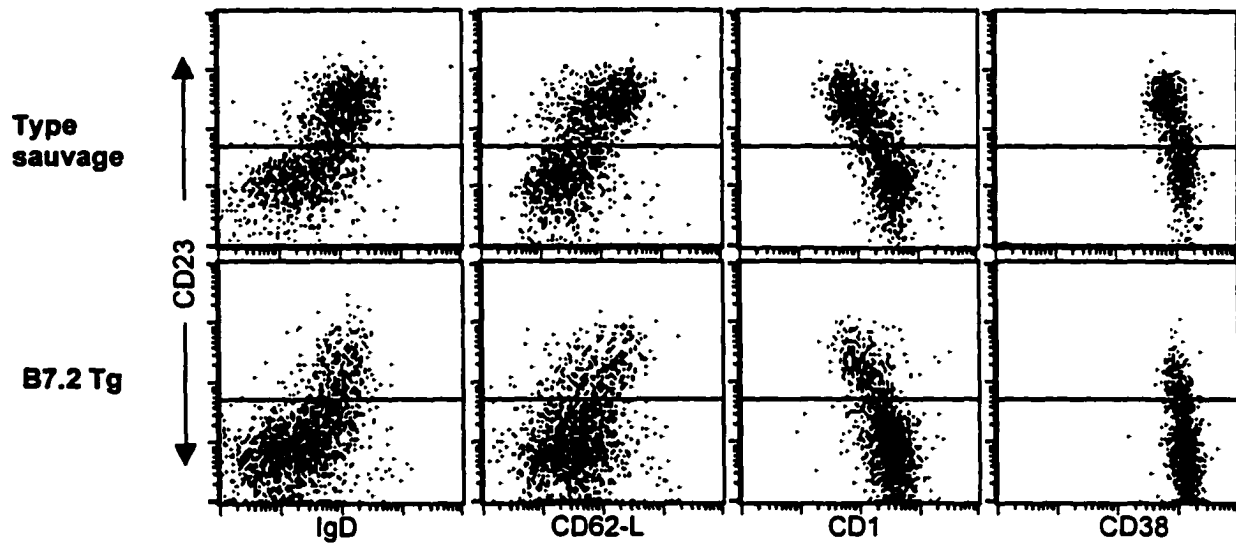


**Tableau II. Sous-polulation de lymphocytes B dans la rate des souris B7.2 Tg et de type sauvage (TS)**

Cellules B	Nombre de cellules ( $\times 10^6$ )	
	TS	B7.2 Tg
CD21 <sup>neg</sup>	$4.6 \pm 1.7$	$1.5 \pm 0.7$
CD21 <sup>int</sup>	$44.7 \pm 8.8$	$13.6 \pm 4.9$
CD21 <sup>élevé</sup>	$7.9 \pm 1.9$	$14.1 \pm 3.7$

Les résultats ont été obtenus par l'analyse des cellules de la rate en cytométrie de flux deux couleurs avec un Ac anti-B220 PE et un Ac anti-CD21 FITC. Les valeurs représentent la moyenne  $\pm$  la déviation standard pour 17 souris.

H.S.A. que les cellules CD21<sup>int</sup> tant dans les souris B7.2 tg que dans les souris de type sauvage. Deux populations de lymphocytes B CD21<sup>élevé</sup> IgM<sup>élevé</sup> H.S.A.<sup>élevé</sup> ont été caractérisées dans les souris contrôles. Les cellules B CD21<sup>élevé</sup> IgM<sup>élevé</sup> H.S.A.<sup>élevé</sup> qui expriment des niveaux faibles de CD23 et d'IgD sont des cellules de la zone marginale (MZ). De plus, ces cellules expriment des niveaux élevés de CD1 et de CD38. L'autre population qui exprime le CD21<sup>élevé</sup> IgM<sup>élevé</sup> H.S.A.<sup>élevé</sup> est nommée lymphocytes B transitionnels de type 2 (T2). Ces cellules sont dérivées des lymphocytes B transitionnels de type 1 et représentent un stade précédant les lymphocytes B matures. Tout comme les lymphocytes B MZ, ils se retrouvent uniquement dans la rate cependant, les cellules T2 expriment le CD23, l'IgD et le CD62-L à des niveaux semblables à ceux des cellules folliculaires (Loder et al., 1999). Pour distinguer les deux populations de lymphocytes B CD21<sup>élevé</sup> des souris B7.2 tg et des souris de type sauvage, nous avons marqués les cellules de la rate avec de Ac contre le CD21, le CD23 et soit l'IgD, le CD62-L, le CD1 ou le CD38 (Figure 7). Dans les souris de type sauvage, les cellules CD21<sup>élevé</sup> se divisent en CD23<sup>élevé</sup> et en CD23<sup>faible</sup>. La population CD21<sup>élevé</sup> CD23<sup>élevé</sup> exprime des niveaux élevés d'IgD et de CD62-L, similaire à ceux des lymphocytes B CD21<sup>int</sup> (résultats non-présentés) et fait donc partie des lymphocytes T2. La population de lymphocytes B CD21<sup>élevé</sup> CD23<sup>faible</sup> est caractérisée par une faible expression d'IgD et de CD62-L. Ces sous-populations expriment également des niveaux plus élevés de CD1 et de CD38 que la population CD21<sup>élevé</sup> CD23<sup>élevé</sup> et représente donc des

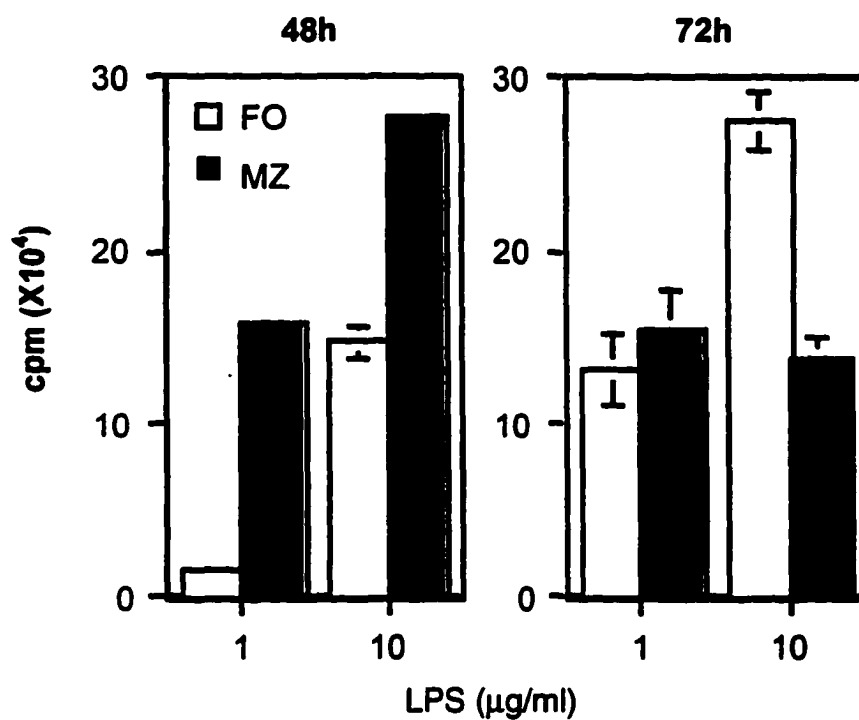


**FIGURE 7.** Phénotype des cellules  $CD21^{elevées}$  de la rate. Les cellules de la rate de souris de type sauvage et B7.2 tg ont été incubées avec de Ac contre le CD21, le CD23 et soit l'IgD, le CD62-L, le CD1 ou le CD38. Les cellules  $CD21^{elevées}$  ont été sélectionnées et l'expression du CD23 avec d'autres marqueurs a été analysée. Ces résultats représentent une de 7 expériences.

lymphocytes B MZ. La population de lymphocytes B T2 représentent environ 11% des B de la rate des souris contrôle ( $10.6 \pm 1.8\%$ ;  $n=7$ ) et les cellules MZ environ 5% des lymphocytes B ( $5.4 \pm 1.4\%$ ;  $n=7$ ). Ces résultats concordent avec ceux publiés récemment (Loder et al., 1999). La fréquence de lymphocytes B  $CD21^{\text{élevé}}CD23^{\text{élevé}}$  parmi les lymphocytes B  $CD21^{\text{élevé}}$  était gradement réduite dans les souris B7.2 tg comparativement aux souris de type sauvage ( $67.0 \pm 3.0\%$  vs  $21.8 \pm 6.0\%$ , dans les souris contrôle et B7.2tg;  $n=7$ ). La majorité des cellules  $CD21^{\text{élevé}}$  expriment des niveaux faibles d'IgD et de CD62-L et des niveaux élevés de CD1 et de CD38 (Figure 5). Le phénotype des cellules  $CD21^{\text{élevé}}CD23^{\text{faible}}$  des souris B7.2 tg est en accord avec celui de lymphocytes B MZ. Le nombre absolu de cellules T2 dans les souris B7.2 tg est environ 2 fois plus faible que le nombre dans les souris de type sauvage ( $57.4 \pm 9.0 \times 10^5$  vs  $28.5 \pm 13.0 \times 10^5$ , dans les souris TS et B7.2 tg;  $n=7$ ). Cependant, il y a une augmentation de 4 à 5 fois dans celui des cellules B MZ dans la rate des souris B7.2 tg en comparaison des souris de type sauvage ( $29.3 \pm 8.3 \times 10^5$  vs  $133.5 \pm 25.7 \times 10^5$ , dans les souris TS et B7.2 tg;  $n=7$ ). Ces résultats indiquent que les lymphocytes B MZ, contrairement aux lymphocytes B folliculaires et transitionnels de type 1 et 2, ne sont pas éliminés.

### **3.5 Les lymphocytes B CD21<sup>élevé</sup>CD23<sup>faible</sup> ont des caractéristiques fonctionnelles semblable aux lymphocytes B de la zone marginale.**

De nombreuses études *in vitro* ont montré que la prolifération de lymphocytes B de la zone marginale répondent différemment des lymphocytes B folliculaires à certains stimuli. Les lymphocytes B de la zone marginale (MZ) sont plus sensibles à une stimulation au LPS que les lymphocytes B folliculaires (Oliver et al., 1997). Bien que d'un point de vue phénotypique la population CD21<sup>élevé</sup>CD23<sup>faible</sup> possède les caractéristiques des lymphocytes B de la zone marginale il est intéressant de déterminer si elle répond comme les lymphocytes B MZ. Les cellules B MZ et folliculaires ont été purifiées par trieur et incubées en présence de LPS. Comme il est montré à la figure 8, les cellules de la zone marginale des souris B7.2 tg prolifèrent deux fois plus que les lymphocytes B folliculaires des souris B7.2 tg stimulées à une concentration optimale de LPS pour une période de 48 heures. La plus grande sensibilité au LPS de cellules de la zone marginale est plus évidente à une concentration sous-optimale. En effet, à une concentration de LPS de 1 µg/mL, la réponse des lymphocytes B de la zone marginale est jusqu'à dix fois supérieure à celle des lymphocytes B folliculaires et elle est similaire à la réponse des lymphocytes B folliculaires stimulés avec une concentration de 10 µg/mL. Les études montrent que l'ampleur de la réponse au LPS n'est pas différente entre les lymphocytes B de la zone marginale et les lymphocytes B folliculaires. Cependant les



**FIGURE 8.** Réponse au LPS des lymphocytes B folliculaires et de la zone marginale des souris B7.2 tg. Les cellules folliculaires et de la zone marginale de souris B7.2 tg ont été triées puis stimulées avec du LPS pour 48 ou 72 heures et l'incorporation de [ $H^3$ ] thymidine est mesurée. Ces résultats correspondent à une expérience et sont représentatif de quatre expériences.

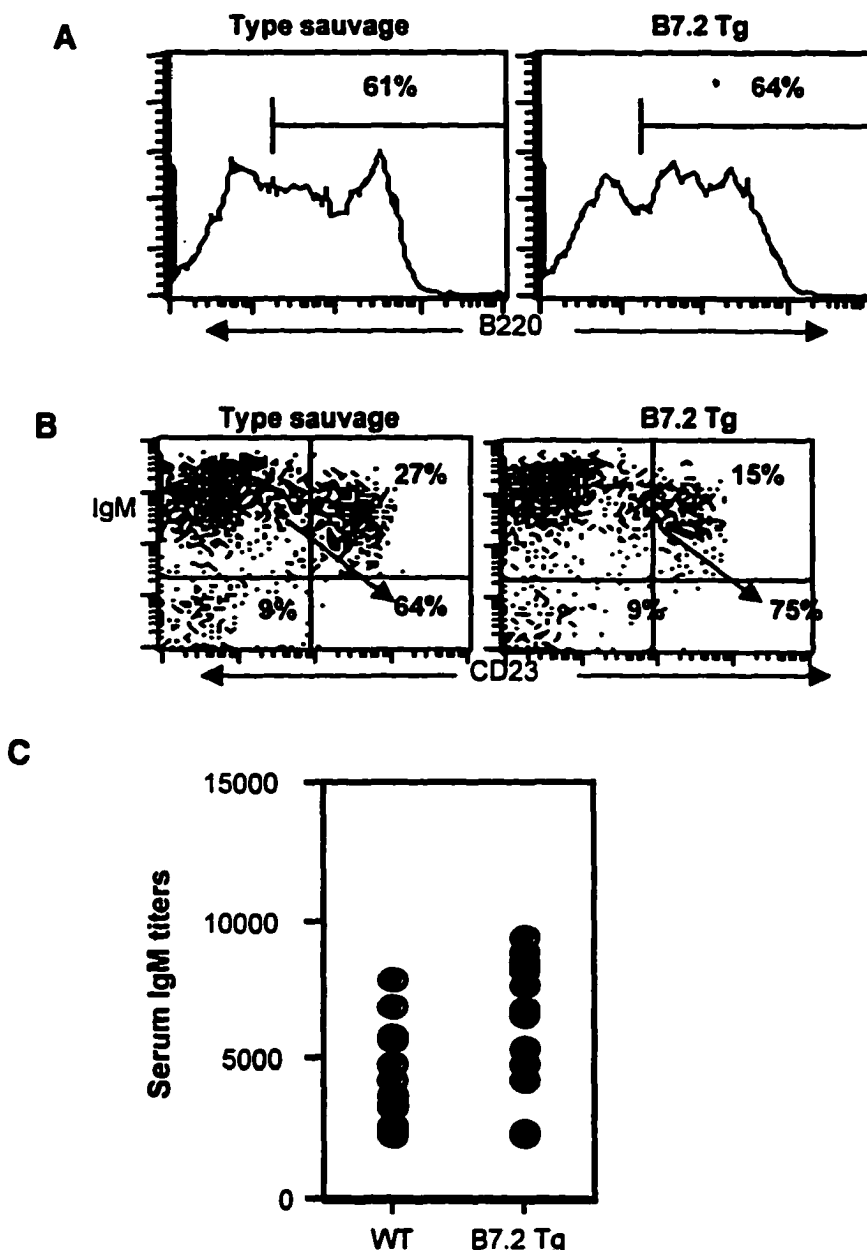
lymphocytes B MZ atteignent leur prolifération maximale plus rapidement que les lymphocytes B folliculaires (Figure 8), comme il a été précédemment montré pour les lymphocytes B de la zone marginale normaux (Oliver et al., 1999). Donc, les cellules CD21<sup>élevé</sup>CD23<sup>faible</sup> isolée de la rate des souris B7.2 tg n'ont pas seulement le phénotype des lymphocytes B de la zone marginale, mais ils possèdent également les propriétés fonctionnelles connues des lymphocytes B de la zone marginale, soit une très grande sensibilité à la stimulation au LPS.

### **3.6 Les lymphocytes B-1 de la cavité péritoniale ne sont pas éliminées dans les souris B7.2 tg.**

En raison de l'élimination des lymphocytes B folliculaires et transitionnels et de la présence des lymphocytes B de la zone marginale, nous nous demandions si les lymphocytes B-1 étaient affectés par l'expression constitutive de B7.2. Bien qu'aucun lien n'ait été fait entre les lymphocytes B de la zone marginale et les lymphocytes B-1, ces derniers possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles semblables (Martin et Kearney, 2000). Tout comme les lymphocytes B MZ, les lymphocytes B-1 expriment des niveaux élevés d'IgM et faibles de CD23 et d'IgD. Ils peuvent se différencier des lymphocytes B de la zone marginale par la faible expression de B220 et l'expression constitutive du CD43. Les lymphocytes

B-1 se retrouvent dans les cavités pleurales et péritoniales des souris adultes. Le nombre de leucocytes dans la cavité péritoniale des souris B7.2 tg est semblable au nombre dans les souris de type sauvage ( $3.30 \pm 0.26 \times 10^6$  vs  $3.35 \pm 0.36 \times 10^6$ , respectivement dans les souris TS (n=4) et Tg (n=7)). Aucune différence n'est observée dans la fréquence de cellules B220<sup>+</sup> péritoniale entre les souris B7.2 tg et les souris de type sauvage (Figure 9A). L'expression de l'IgM et du CD23 par les cellules péritoniales a également été analysée. Une grande proportion de cellules ont un phénotype caractéristique des lymphocytes B-1 (IgM<sup>élevé</sup>CD23<sup>-</sup>) (Figure 9B, cadran haut à gauche). Le marquage avec le CD23 et le CD21 a montré que ces cellules IgM<sup>élevé</sup>CD23<sup>-</sup> étaient bel et bien des cellules B-1 (résultats non-présentés). La fréquence de cellules B péritoniales ayant un phénotype B-2 (IgM<sup>faible</sup>CD23<sup>+</sup>)(cadran haut à droite) est diminuée d'environ 50% dans les souris B7.2 tg comparativement aux souris de type sauvage (Figure 7B). En accord avec le maintien de cellules B-1 dans les souris B7.2 tg, les niveaux d'IgM dans le sérum des souris B7.2 tg est équivalent à celui retrouvé dans les souris de type sauvage (Figure 9C). Il a été préalablement montré que les lymphocytes B-1 sont les principaux responsables de la production d'IgM en absence d'immunisation (Stall et al., 1996). Donc, ces résultats montrent que les lymphocytes B-1, tout comme les lymphocytes B MZ, ne sont pas éliminés dans les souris B7.2 tg.

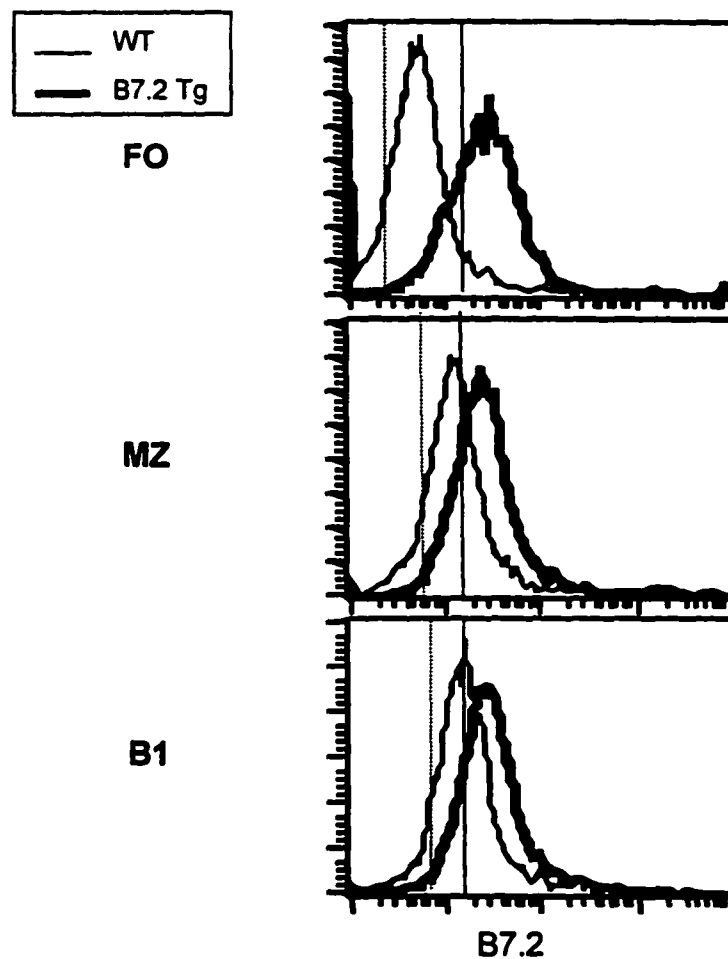




**FIGURE 9.** Les cellules péritoniales B-1 ne sont pas éliminées dans les souris B7.2 tg. Les cellules péritoniales des souris de type sauvage et B7.2 tg sont marquées avec des Ac contre le B220, l'IgM et le CD23, puis analysées par cytométrie de flux. **A**, représentation de l'expression de B220. Les chiffres représentent la fréquence de cellules B220<sup>+</sup> parmi les cellules nucléées. **B**, expression du CD23 et de l'IgM par les cellules péritoniales B220<sup>+</sup>. Les nombres représentent le pourcentage de lymphocytes B220<sup>+</sup> pour chacun des phénotypes. Les résultats montrent une expérience représentative de cinq. **C**, titres d'IgM dans le sérum des souris B7.2 tg.

### **3.7 Expression de B7.2 sur les différentes populations de lymphocytes B des souris B7.2 tg.**

Une des possibilité pouvant expliquer l'élimination spécifique des lymphocytes B transitionnels et folliculaires est que le transgène B7.2 est exprimé uniquement par ces derniers. Nous avons donc regardé l'expression basale de B7.2 sur les lymphocytes B folliculaires, de la zone marginale et B-1 de souris B7.2 tg et de type sauvage. Dans les souris B7.2 tg, le niveau d'expression de B7.2 sur les lymphocytes B folliculaires, de la zone marginale et B-1 est similaire (Figure 10) et identique à celui exprimé par les lymphocytes B de la rate de souris B7.2 tg déficientes en lymphocytes T (résultats non-présentés). Donc, le maintien des lymphocytes B de la zone marginale et B-1 n'est pas dû à une absence du transgène dans ces populations de lymphocytes B. Cependant, dans les souris de type sauvage, les cellules de la zone marginale et B-1 expriment des niveaux plus élevés de B7.2 que les lymphocytes B folliculaires (Figure 10). Il faut cependant préciser que les lymphocytes B de la zone marginale et B-1 des souris B7.2 tg expriment des niveaux de B7.2 supérieurs à ceux observées chez les souris de type sauvage.



**FIGURE 10.** Expression de B7.2 sur les différentes populations de lymphocytes B des souris B7.2 tg et de type sauvage. Les cellules du péritoine ont été marquées avec l'IgM, le CD23 et le B7.2. L'expression de B7.2 a été analysée pour les cellules de la rate  $\text{IgM}^+\text{CD23}^+$  (folliculaire) ou  $\text{IgM}^{\text{élevé}}\text{CD23}^{\text{faible}}$  (zone marginale) et pour les cellules péritoniales  $\text{IgM}^{\text{élevé}}\text{CD23}^-$  (B1). Les lignes verticales représentent la moyenne d'intensité d'expression du B7.2 par les différentes populations de lymphocytes B. Les résultats représentent une de cinq expériences similaires.

## **DISCUSSION**

La stimulation complète des lymphocytes T requiert la présence d'un signal de co-stimulation. Le signal de co-stimulation le plus étudié est celui médié par la liaison des récepteurs CD28 et CTLA-4 avec leurs ligands B7.1 et B7.2. Les souris transgéniques pour la molécule B7.2 voient une diminution dans le nombre de lymphocytes B retrouvés dans leur moelle osseuse et leurs organes lymphoïdes secondaires (Fournier et al., 1997, Van Parijs et al., 1997). Cette élimination nécessite la présence des lymphocytes T et de la molécule CD28 (Fournier et al., 1997). De plus, la voie apoptotique Fas-Fas-Ligand n'est pas impliquée dans cette élimination (Fournier et al., 1997). Nous nous sommes intéressés à ce phénomène.

### **4.1 Rôle de la molécule Bcl-2 dans l'élimination des lymphocytes B**

Pour déterminer l'implication de la mort programmée dans l'élimination des lymphocytes B, nous avons produit des souris B7.2 tg exprimant un transgène Bcl-2 dans leurs lymphocytes B. Les souris B7.2/Bcl-2 double tg recouvrent des nombres normaux de lymphocytes B dans leur moelle osseuse et dans leurs organes lymphoïdes secondaires. Ces résultats suggèrent que l'élimination des lymphocytes B passe par un mécanisme apoptotique inhibé par la molécule Bcl-2. Le mécanisme responsable de

l'élimination n'est pas encore éclairci. Le signal est soit donné directement par la molécule B7.2 ou donné par les lymphocytes T suite à la liaison de la molécule B7.2 avec le récepteur CD28. De nombreux sites de phosphorylation se retrouvent sur la queue cytoplasmique de la molécule B7.2. Récemment, il a été montré que l'aggrégation de la molécule B7.2 augmente la production d'anticorps en présence d'IL-4 (Kasprowicz et al., 2000). Donc, la molécule B7.2 pourrait signaler dans les lymphocytes B et être responsable de l'élimination de ces derniers. Cependant, la viabilité des lymphocytes B B7.2 transgéniques n'est pas diminuée suite à l'incubation de ces derniers dans des plaques couvertes avec des anticorps anti-B7.2 (Sylvie Fournier, résultats non-publiés).

#### **4.2 Présence accrue de lymphocytes B immatures dans les souris B7.2/Bcl-2**

Dans les organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2/Bcl-2, il y a une augmentation des lymphocytes B immatures. Les lymphocytes B de ces souris semblent incapables de compléter leur différenciation. Dans les souris exprimant une immunoglobuline contre le HEL (Hen Egg Lysozyme) et un HEL membranaire (HELlg/HELm), il ya élimination des lymphocytes B dans la moelle osseuse. Lorsque ces souris expriment également la molécule Bcl-2, il y a accumulation des lymphocytes B immatures dans les

organes lymphoïdes secondaires (Hartley et al., 1993). Cette caractéristique est en accord avec ce qui est observé dans notre modèle. La présence de cellules pré-B dans les organes lymphoïdes secondaires a également été observée dans les souris qui expriment des immunoglobulines tg causant leur élimination tout en surexprimant la molécule Bcl-2 (Hartley et al., 1993) et dans les souris xid, rag-2 déficiente, et déficiente dans le récepteur à IL-7 (Fang et al., 1998, Strasser et al., 1994, Young et al., 1997 et Maraskovsky et al., 1998). L'arrêt du développement des lymphocytes B dans les systèmes où il y a surexpression de Bcl-2 est probablement dû à la capacité de cette dernière à arrêter le cycle cellulaire (O'Reilley et al., 1997). Dans les souris HEL-Ig/mHEL tg, l'expression de la molécule Bcl-X<sub>L</sub>, contrairement à l'expression de Bcl-2, permet de retrouver des lymphocytes B matures en périphérie (Fang et al., 1998). Donc, la molécule Bcl-X<sub>L</sub> et la molécule Bcl-2 permettent la survie des lymphocytes B dans ce système mais, seulement la molécule Bcl-X<sub>L</sub> permet la différenciation de ces derniers.

La molécule Bcl-2 empêche donc l'élimination des lymphocytes B dans les souris B7.2 tg mais ne permet pas la différenciation de ces lymphocytes B. Cependant, la voie empruntée pour causer l'élimination des lymphocytes B n'est pas connue.

### **4.3 Élimination à partir du stade pré-B dans la moelle osseuse**

Les lymphocytes B sont éliminés dans la moelle osseuse à partir du stade pré-B. Les lymphocytes pro-B ne sont pas éliminés même s'ils expriment des niveaux élevés de B7.2 (résultats non-présentés) contrairement aux lymphocytes pré-B, immatures et matures. L'élimination ne débute donc, que suite au réarrangement complet de la chaîne lourde de leur immunoglobuline. L'élimination des lymphocytes B des souris B7.2 tg est peut-être due au fait que la molécule B7.2 est exprimée dans la moelle osseuse par les cellules qui répondent aux antigènes du soi et donc, les identifient comme des cellules autoréactives. En accord avec cette possibilité, l'expression de B7.2 est induite suite à la stimulation in vitro du BCR des lymphocytes B de la moelle osseuse et l'expression de B7.2 est augmentée sur les lymphocytes B IgM<sup>faible</sup> dans les souris où le domaine intracellulaire d'Ig- $\alpha$  est tronqué (mb-1 <sup>$\Delta C/\Delta C$</sup> ) (Tores et Hafen, 1999).

### **4.4 Augmentation des lymphocytes B de la zone marginale.**

Dans les souris B7.2 tg il y a une diminution de lymphocytes TI, TII et folliculaires (Fo) retrouvés dans la rate. Cependant, dans ces souris, une population particulière de lymphocytes B de la rate, les lymphocytes B de la zone marginale, voient leurs nombres augmentés.

L'élimination observée chez les différentes populations de lymphocytes B de la rate est variable. En effet, il y a une diminution d'environ 70% des cellules B TI et Fo alors que la diminution est de 30% pour les lymphocytes B TII. Certains clones de lymphocytes B vont préférentiellement diriger les lymphocytes B vers les lymphocytes B MZ. Donc, certains lymphocytes B matures pourraient être sélectionnés pour devenir des lymphocytes B MZ (Martin et Kearney, 2000). Dans les souris CD45 déficientes, il n'y a pas de lymphocytes B folliculaires puisque le développement des lymphocytes B arrête au stade TII mais, les lymphocytes B de la zone marginale sont présents (Loder et al., 1999). Les souris Baff transgéniques ont une augmentation de chacune des populations de lymphocytes B retrouvés dans la rate cependant, l'augmentation est plus importante pour les lymphocytes B TII et MZ (Batten et al., 2000). Les résultats obtenus dans notre modèle tendent à être en accord avec l'hypothèse voulant que les lymphocytes B MZ proviennent des lymphocytes B TII (Batten et al., 2000). L'augmentation des lymphocytes B MZ dans différents modèles murins pourraient être le résultat d'un mécanisme compensatoire suite à la diminution de la diversité des lymphocytes B (Martin et Kearney, 2000) puisque dans les souris B7.2/Bcl-2 il n'y a pas d'augmentation dans le nombre de lymphocytes B MZ (Résultats non-présentés). Une autre possibilité est la présence accrue de facteurs de survie en raison de la diminution du nombre de lymphocytes B folliculaires.



#### **4.5 Présence des lymphocytes B1 dans les souris B7.2 tg**

En plus des lymphocytes B MZ, les lymphocytes B1 résistent à l'apoptose dans les souris B7.2 transgéniques. La provenance de ces lymphocytes B1 n'est pas connue. Deux hypothèses tentent présentement d'expliquer la génération de ces derniers. La première hypothèse veut qu'il y ait deux cellules progénitrices différentes, une pour les lymphocytes B1 et une pour les lymphocytes B2. Cette hypothèse pourrait expliquer la présence des cellules B1 dans les souris B7.2 transgéniques et l'élimination des lymphocytes B Fo, T1 et TII. L'autre hypothèse s'attarde à la possibilité que la spécificité de l'immunoglobuline retrouvée à la surface des lymphocytes B dirige les lymphocytes B2 vers des lymphocytes B1. Tout comme pour les lymphocytes B MZ, la molécule B7.2 exprimée constitutivement par les lymphocytes B-1 ne provoque pas leur élimination.

#### **4.6 Caractéristiques semblables entre les lymphocytes B-1 et MZ.**

Les lymphocytes B1 et MZ sont deux populations particulières de lymphocytes B matures. Ces deux populations possèdent des caractéristiques phénotypiques et fonctionnelles semblables. Dans notre modèle, ces deux populations résistent à l'élimination observé dans les souris B7.2 tg.

De nombreux modèles murins ont montré l'importance de certaines molécules pour ces deux populations. Il semble que la résistance à l'élimination dans les souris B7.2 tg soit une autre caractéristique commune à ces deux populations. La résistance à l'élimination de ces deux populations vient probablement du fait que ces deux populations ont une spécificité pour les antigènes du soi ou les antigènes de l'environnement (Pillai, 1999 et Chen et al., 1997). De plus, elles sont probablement sélectionnées positivement par des antigènes du soi et/ou environnementaux (Su et Tarakhovsky, 2000 et Martin et Kearney, 2000). Nous avons montré que les lymphocytes B MZ et B-1 expriment la molécule B7.2, suggérant que ces lymphocytes B ont rencontré des antigènes. La sélection et la survie des lymphocytes B dépend de l'engagement de leur IgM de surface. Les lymphocytes B folliculaires de souris de type sauvage n'expriment pas la molécule B7.2 à leur surface donc, le signal nécessaire à leur survie et leur sélection est plus faible que celui requis par les lymphocytes B MZ et B-1. La mutation de certains gènes impliqués dans la signalisation du BCR provoque une faible signalisation via le BCR ce qui résulte en l'absence de lymphocytes B-1 (Pillai, 1999). La possibilité que la génération des lymphocytes B-1 et MZ nécessitent des signaux plus forts, pourrait expliquer leur résistance à l'élimination dans les souris B7.2 tg. Le signal nécessaire pour la génération des lymphocytes B-1 et MZ est peut-être suffisant pour induire la présence de molécules anti-apoptotiques nécessaire à la survie.

Selon cette hypothèse, le traitement des lymphocytes B folliculaires des souris B7.2 tg avec un anticorps anti-IgM devrait protéger ces derniers de l'élimination. D'autres signaux sont probablement impliqués dans la génération des lymphocytes B-1 et MZ. En effet, la génération des lymphocytes B MZ et B-1 nécessitent la présence de la molécule CD19 puisqu'en l'absence de cette dernière, il y a absence des lymphocytes B-1 et MZ (Martin et al., 2000).

En résumé, cette étude a montrée que l'expression constitutive de B7.2 sur les lymphocytes B provoque une élimination inhibée par la molécule Bcl-2. L'élimination est sélective et empêche la génération de lymphocytes B folliculaires mais, ne touche pas au développement des lymphocytes B MZ et B-1. Des études plus approfondies permettront de mieux comprendre les mécanismes régissant l'homéostasie des lymphocytes B.

## **CONCLUSIONS**

Dans la présente étude, nous avons établi que l'élimination observée dans les souris B7.2 tg se fait par apoptose. De plus, les cellules B de la zone marginale et les lymphocytes B-1 ne sont pas éliminées dans les souris B7.2 tg.

Nous avons identifié les populations de lymphocytes B de la moelle osseuse affectées par l'élimination dans les souris B7.2 tg. Les lymphocytes pro-B sont épargnés par l'élimination mais, chacune des populations retrouve des nombres normaux de lymphocytes B dans les souris B7.2/Bcl-2. Les organes lymphoïdes secondaires voient également leur nombre de lymphocytes B revenir à la normale dans les souris B7.2/Bcl-2. De plus, dans les organes lymphoïdes secondaires des souris B7.2/Bcl-2 il y a accumulation de cellules B immatures.

L'élimination n'empêche pas la génération de lymphocytes MZ et B-1 dans les souris B7.2 tg. Nous avons montré qu'au niveau fonctionnel et phénotypique les cellules, B MZ et B-1, présentes dans les souris B7.2 tg sont semblables aux cellules retrouvées dans les souris de type sauvage. Les lymphocytes B MZ répondent plus rapidement à des quantités plus faibles de LPS dans les souris B7.2 tg comme dans les souris de type sauvage. Pour les lymphocytes B-1, la présence d'une quantité équivalente d'IgM dans

les souris transgéniques et de type sauvage en absence d'immunisation, montre que ces derniers sont fonctionnellement semblable dans les deux types de souris.

Des études portant sur la détermination du signal menant à l'apoptose des lymphocytes B seraient intéressantes. Pour ce faire, l'utilisation d'un modèle *in vitro* serait utile. De plus, la détermination des différents gènes activés dans les cellules B MZ, B-1 et folliculaires permettrait de mieux comprendre les différences entre chacune des populations. La détermination du rôle de la signalisation via le BCR dans la génération des lymphocytes B MZ et B1 pourrait être étudiée en croisant des souris B7.2 tg avec des souris xid, déficiente dans la signalisation ou avec des souris dont la signalisation via le BCR est augmentée. De nombreuses études pour approfondir les connaissances dans la costimulation et la génération des différentes populations de lymphocytes doivent être effectuées.

## **REMERCIEMENTS**

Je désire remercier ma directrice de recherche, Dr Sylvie Fournier, pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour toute l'aide et les nombreux conseils qu'elle m'a prodigués tout au long de ma maîtrise.

J'aimerais également remercier les stagiaires qui ont participé à ce projet, Geneviève Bernier, Josée Paradis et Jonathan Perrault. Je remercie également Jonathan Nicol, étudiant à la maîtrise dans le laboratoire du Dr Sylvie Fournier, avec qui j'ai eu beaucoup de plaisir lors de ma maîtrise.

Je remercie tous les chercheurs, les étudiants et le personnel du département d'immunologie qui ont rendu mon séjour des plus agréables.

Aux Drs. Jana Stankova et Brian Talbot, mes remerciements pour avoir accepté de consacrer du temps à la correction de ce mémoire.

## RÉFÉRENCES

- Adams, J. M. & Cory, S. 1998. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. **281**, 1322-1325.
- Arima, T., Rehman, A. Hickey, W. F. & Flye, M. W. 1996. Inhibition by CTLA-4-Ig of experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* **156**, 4916.
- Askenase, P. W. et al. 1999. A new paradigm of T cell allergy: requirement for the B-1 cell subset. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **118**, 145.
- August, A., Gibson, S., Kawakami, K., Kawakami, T., Mills, G. B. & Dupont, B. 1994. CD28 is associated with and induces the immediate tyrosine phosphorylation and activation of the Tec family kinase ITK/EMT in the human jurkat leukemic T-cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 9347.
- Batten, M., Groom, J., Cachero, T. G., Qian, F., Schneider, P., Tschopp, J., Browning, J. L. & Mackay, F. 2000. BAFF mediates survival of perihelal immature B lymphocytes. *J. Exp. Med.* **192**, 1453.
- Blume-Jensen, P., Jankrecht, R. & Hunter, T. 1998. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI-3-Kinase and subsequent AKI-mediated phosphorylation of BAD on Ser 136. *Curr. Biol.* **8**, 779.
- Boise, L. H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C. E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, C. A., Mao, X., Nunez, G. & Thompson, C. B. 1993. Bcl-X and Bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell*. **74**, 597.
- Boise, L. H., Minn, A. J., Noel, P. J., June, C. H., Accavitti, M. A., Lidsten, T. & Thompson, C. B. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-X<sub>L</sub>. *Immunity* **3**, 87.
- Brunner, M. C., Chambers, C. A., Chan, F. K., Hanke, J., Winoto, A. & Allison, J. P. 1999. CTLA-4-mediated inhibition of early events of T cell proliferation. *J. Immunol.* **162**, 5813.
- Chen, X., Martin, F., Forbush, K. A., Pelmutter, R. M. & Kearney, J. F. 1997. Evidence for selection of a population of multi-reactive B cells into the splenic marginal zone. *Int. Immunol.* **9**, 27.
- De Simone, R., Giampaolo, A., Gionietto, B., Gallo, P., Levi, G. Peschle, C. & Aloisi, F. 1995. The costimulatory molecule B7 is expressed on human

microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesion. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **54**, 175.

Evan, G. & Littlewood, T. 1998. A matter of life and cell death. *Science*. **281**, 1317.

Fadok, V. A., Voelker, D. R., Cambell, O. A., Cohen, J. J., Bratton, D. L. & Henson, P. M. 1992. Exposure to phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J. Immunol.* **148**, 2207.

Fang, W., Weintraub, B. C., Dunlap, B., Gardide, P., Pape, K. A., Jenkins, M. K., Goodnow, C. C., Mueller, D. L. & Behrens, T. W. 1998. Self-reactive B lymphocytes overexpressing Bcl-X escape negative selection and are tolerized by clonal anergy and receptor editing. *Immunity*. **9**, 35.

Finkelman, F. D., Holmes, J. M., Dukhanina, O. I. & Morris, S. C. 1995. Cross-linking of membrane immunoglobulin D, in the absence of T cell help, kill mature B cells in vivo. *J. Exp. Med.* **181**, 515.

Firpo, E. J., Koff, A., Solomon, M. J. & Roberts, J. M. 1994. Inactivation of a Cdk2 inhibitor during interleukin 2-induced proliferation of human T lymphocytes. *Cell* **156**, 4071-4074.

Fournier, S., Rathmell, J. C., Goodnow, C. C. & Allison, J. P. 1997. T-cell mediated elimination of B7.2 transgenic mice. *Immunity* **6**, 327.

Freeman, G. J., Borriello, F., Hodes, R. J., Reiser, H., Hathcock, K. S., Laszlo, G., McKnight, A. J., Kim, J. L. D., Lombard, D. B., Gray, G. S., Nadler, L. M. & Sharpe, A. H., 1993. Cloning of B7.2: a CTLA-4 counter-receptor that costimulates hyman T cell proliferation. *Science* **262**, 909.

Freeman, G. J., Freedman, A. S., Segil, J. M., Lee, G., Whitman, J. F. & Nadler, L. M. 1989. B7, a new member of the Ig superfamily with unique expression on activated and neoplastic B cells. *J. Immunol.* **143**, 2714.

Garcia-Cozar, F. J., Molina, I. J., Cuadrado, M. J., Marubayashi, M., Pena, J. & Santamaria, M. 1996. Defective B7 expression on antigen presenting cells underlying T cell activation abnormalities in systemic lupus erythematosus (SLE) patients. *Clin. Exp. Immunol.* **104**, 72.

Guerder, S., Eynon, E. E. & Flavell, R. A. 1998. Autoimmunity without diabetes in transgenic mice expressing beta cell-specific CD86 but not CD80: parameters that trigger progression to diabetes. *J. Immunol.* **161**, 2128.



Guerder, S., Picardella, D. E., Linsley, P. & Flavell, R. A. 1994. The role of the T cell costimulator B7.1 in autoimmunity and the induction and maintenance of tolerance to peripheral antigen. *Immunity*. **1**, 155.

Guinamard, R., Okigaki, M., Schlessinger, J. & Ravetch, J. V. 2000. Absence of marginal zone B cells in syk-2-deficient mice defines their role in the humoral response. *Nature Immunol.* **1**, 31.

Hardy, R. R., Carmack, C. E., Shinton, S. A., Kemp, J. D. & Hayakawa, K. 1991. Resolution of characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow. *J. Exp. Med.* **173**, 1213.

Hartley, S. B., Cooke, M. P., Fulcher, D. A., Harris, A. W., Cory, S., Basten, A. & Goodnow, C. C. 1993. Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death. *Cell*. **72**, 325.

Hayakawa, K., Hardy, R. R., Parks, D. R. & Herzenberg, L. A. 1983. The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient and autoimmune mice. *J. exp. Med.* **157**, 202.

Herzenberg, L. A., Stall, A. M., Lalor, P. A., Moore, W. A. & Parks, D. R. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol. Rev.* **93**, 81.

Hu, Y., Benedict, M. A., Wu, D., Inohara, N. & Nunez, G. 1998. Bcl-X<sub>L</sub> interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **95**, 4386-4391.

Hutchcroft, J. E. & Bierer, B. E. 1994. Activation-dependent phosphorylation of the T-lymphocyte surface receptor CD28 and associated proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 3260.

June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M. & Thompson, C. B., 1994, The B7 and the CD28 receptor families. *Immunol. Today* **15**, 321.

Kaneko, H., Sarto, K., Hashimoto, H., Yagita, H., Okumura, K. & Azuma, M. 1996. Preferential elimination of CD28+ T cells in systemic lupus erythematosus (SLE) and the relation with activation-induced apoptosis. *Clin. Exp. Immunol.* **106**, 218.

Kantor, A. B., Stall, A. M., Adams, S. & Herzenberg, L. A. 1992. Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**, 3320.

Kasprowicz, D. J., Kohm, A. P., Berton, M. T., Chruscinski A. J., Sharpe, A. & Sanders, V. M. 2000. Stimulation of the B cell receptor, CD86 (B7.2), and the  $\beta_2$ -adrenergic receptor intrinsically modulates the level of IgG1 and IgE produced per B cell. *J. Immunol.* **165**, 680.

Kerr, J. F., Wyllie, A. H. & Currie, A. R. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer.* **26**, 239-257.

Kroese, F. G., Butcher, E. C., Stall, A. M., Lalor, P. A., Adams, S. & Herzenberg, L. A. 1989. Many of the IgA producing plasma cells in murine gut are derived from self-replenishing precursors in the peritoneal cavity. *Int. Immunol.* **1**, 75.

Krummel M. F., Sullivan, T. J. & Allison, J. P. 1996. Superantigen responses and costimulation: CD28 and CTLA-4 have opposing effects on T cell expansion *ion vitro* and *in vivo*. *Int. Immunol.* **8**, 519.

Krummel, M. F. & Allison, J. P. 1995. CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of the T cells to stimulate. *J. Exp. Med.* **182**, 459.

Kumararatne, D. S. & MacLennan, I. C. M. 1981. Cells of the marginal zone of the spleen are lymphocytes derived from recirculating precursors. *Eur. J. Immunol.* **11**, 865.

Lafferty, K.J. & Cunningham, A.J., 1975, A new analysis of allogeneic interactions. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* **53**, 27.

Lam, K. P. & Rajewsky, K. 1999. B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development. *J. Exp. Med.* **190**, 471.

Lenschow, D. J., Walunas, T. L. & Bluestone, J. A. 1996. CD28/B7 system of T cell costimulation. *Annu. Rev. Immunol.* **14**, 233-258.

Li, P. 1997. *Cell.* **91**, 479.

Lindsten, T., June, C. H., Ledbetter, J. A., Stella, G. & Thompson, C. B. 1989. Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway. *Science* **244**, 339.

Lindsten, T., Lee, K. P., Harris, E. S., Petryniak, B., Craighead, N., Reynolds, P. J., Lombard, D. B., Freeman, G. J., Nadler, L. M., Gray, G. S., Thompson, C. B. & June, C. H. 1993. Characterisation of CTLA-4 structure and expression on hman T cells. *J. Immunol.* **151**, 3489.

Linsley, P. S., Brady, W., Urnes M., Grosmaire, L. S., Damle, N. K. & Ledbetter, J. A. 1991. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J. Exp. Med.* **174**, 561.

Linsley, P. S., Greene, J. L., Brady, W., Bajorath, J., Ledbetter, J. A. & Peach R. 1994. Human B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors. *Immunity* **1**, 793.

Linsley, P.S. & Ledbetter, J. A., 1993, The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. *Annual review of immunology*, **11**, 191-212.

Loder, F., Mutschler, B., Ray, R. J., Paige, C. J., Sideras, P., Torres, R., Lamer, M. C. & Carsetti, R. 1999. B cell development in the spleen takes place in discrete steps and is determined by the quality of B cell receptor-derived signal. *J. Exp. Med.* **190**, 75.

Lund et al. 1995. *Eur. J. Immunol.*

Macpherson, A. J., Gatto, D., Sanisbury, E., Harriman, G. R., Hengartner, H. & Zinkernagel, R. M. 2000. A primitive T cell-independent mechanism of intestinal mucosal IgA responses to commensal bacteria. *Science*. **288**, 2222.

Maraskovsky, E., Peschon, J. J., McKenna, H., Teepe, M. & Strasser, A. 1998. Overexpression of Bcl-2 does not rescue B lymphopoiesis in IL-7 receptor-deficient mice but can enhance survival of mature B cells. *Int. Immunol.* **10**, 1367.

Marengere, L. E. M., Waterhouse, P., Duncan, G. S., Mittrucker, H.-W., Feng, G. -S. & Mak, T. W. 1996. Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine-phosphatase Syp association with CTLA-4. *Science*. **272**, 1170.

Martin, F. & Kearney, J. F. 2000. B-cell subsets and the mature preimmune repertoire. Marginal zone and B1 cells as part of a natural immune memory. *Immunol. Rev.* **175**, 70.

Martin, F. & Kearney, J. F. 2000. Positive selection from newly formed to marginal zone B cells depends on the rate of clonal production, CD19, and btk. *Immunity*. **12**, 39.

McDonnell, T. J., Beham, A., Sarkiss, M., Andersen, M. M. & Lo, P. 1996. Importance of the Bcl-2 family in cell death regulation. *Experientia*. **52**, 1008.

McDonnell, T. J., Deane, N., Platt, F. M., Nunez, G., Jaeger, U., Mckearn, J. P. & Korsmeyer, S. J. 1989. Bcl-2-immunoglobulin transgenic mice

demonstrate extended B cell survival and follicular lymphoproliferation. *Cell*. **57**, 79.

Melchers, F. et al. 1995. Positive and negative selection events during B lymphopoiesis. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 214.

Mueller, D. L. 2000. T cells: A proliferation of costimulatory molecules. *Curr. Biol.* **10**, R227.

Muzio, M., Stockwell, B. R., Stennicke, H. R., Salvesen, G. S. & Dixit, V. M. 1998. An induced proximity model for caspase-8 activation. *J. Biol. Chem.* **273**, 2926.

Nagasawa, M., Melamed, I., Kupfer, A., Gelfand, E. W. & Lucas, J. J. 1997. Rapid nuclear translocation and increased activity of cyclin-dependant kinase 6 after T cell activation. *J. Immunol.* **158**, 5146-5154.

Namen, A. et al., 1988. Stimulation of B cell progenitors by cloned murine interleukine-7. *Nature*. **333**, 571.

Nemazee, D. A. & Burki, K. 1989. Clonal deletion of B lymphocytes in a transgenic mouse bearing anti-MHC class I antibody genes. *Nature*. **337**, 562.

Nunez, J., Klasen, S., Franco, M. D., Lipcey, C., Mawas, C., Bagnasco, M. & Olive, D. 1993. Signalling through CD28 T-cell activation pathway involves an inositol phospholipid-specific phospholipase C activity. *Biochem. J.* **293**, 835.

O'Reilley, L. A., Harris, A. W., Tarlinton, D. M., Corcoran, L. M. & Strasser, A. 1997. Expression of a Bcl-2 transgene reduces proliferation and slows turnover of developing B lymphocytes in vivo. *J. Immunol.* **159**, 2301.

Oliver, A. M., Martin, F. & Kearney, J. F. 1999. IgM<sup>high</sup>CD21<sup>high</sup> lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells. *J. Immunol.* **162**, 7198.

Oliver, A. M., Martin, F., Gartland, G. L., Carter, R. H. & Kearney, J. F. 1997. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2366.

Oliver, M. A., Martin, F., Gartland, L. G., Carter, R. H. & Kearney, J. F. 1997. Marginal zone B cells exhibit unique activation, proliferative and immunoglobulin secretory responses. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2366.

Oltvai, Z. N., Millman, C. L. & Korsmeyer, S. J. 1993. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* **74**, 609-619.

Osmond, D. G. & Everett, N. B. 1964. Radioautographic studies of bone marrow lymphocytes *in vivo* and in diffusion chamber cultures. *Blood.* **196**, 488.

Pillai, A. 1999. The chosen few? Positive selection and the generation of naïve B lymphocytes. *Immunity.* **10**, 493.

Raff, M. C., 1992. Social controls on cell survival and cell death. *Nature.* **356**, 397-400.

Rajewsky, K. 1996. Clonal selection and learning in the antibody system. *Nature.* **381**, 751.

Rolink, A. & Melchers, F. 1991. Molecular and cellular origin of B lymphocytes diversity. *Cell.* **66**, 1081.

Sarasin, A. & Stary, A. 1997. Human cancer and DNA repair-deficient diseases. *Cancer Detect. Prev.* **21**, 406.

Schneider, H., Prasad, K. V. S., Shoelson, S. E. & Rudd, C. E. 1995. CTLA-4 binding to the lipid kinase phosphatidylinositol 3-kinase in T cells. *J. Exp. Med.* **181**, 351.

Schwartz, R.H., 1990, A cell culture model for T lymphocytes clonal anergy. *Science* **248**, 1349.

Stall, A. M., Wells, S. M. & Lam, K. P. 1996. B-1 cells: unique origins and functions. *Semin. Immunol.* **8**, 45.

Strasser, A., Harris, A. W., Corcoran, L. M. & Cozy, S. 1994. Bcl-2 expression promotes B- but not T-lymphoid development in scid mice. *Nature.* **368**, 457.

Strasser, A., Whittingham, S., Vaux, D. L., Bath, M. L., Adams, J. M., Cory, S. & Harris, A. W. 1991. Enforced Bcl-2 expression in B lymphoid cells prolongs antibody responses and elicits autoimmune disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **19**, 8661.

- Su, I. & Tarakhovsky, A. 2000. B-1 cells: orthodox or conformist? *Curr. Opin. Immunol.* **12**, 191.
- Tedder, T. F., Inaoki, M. & Sato, S. 1997. The CD19-CD21 complex regulates signal transduction thresholds governing humoral immunity and autoimmunity. *Immunity*. **6**, 107.
- Thornberry, N. A. & Lazebnik, Y. 1998. Caspases: Enemies within. *Science*. **281**, 1312-1316.
- Tivol, E. A., Borriello, F., Schweitzer, A. N. & Lynch, W. P. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity* **3**, 541.
- Torres, R. M. & Hafen, K. 1999. A negative regulatory role for Ig- $\alpha$  during B cell development. *Immunity*. **11**, 527.
- Tsujimoto, Y. 1998. Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria?. *Genes to Cell*. **3**, 697-707.
- Turka, L. A., Ledbetter, J. A., Lee, K., June, C. H., Thompson, C. B., 1990, CD28 is an inducible T cell surface antigen that transduces a proliferative signal in CD3+ mature thymocytes. *J. Immunol* **144**, 1646-1653.
- Van Parijs, L., Sethna, M.P., Schweitzer, A. N., Borriello, F., Sharpe, A. H. & Abbas, A. K. 1997. Functional consequences of dysregulated B7.1 (CD80) and B7.2 (CD86) expression in B or T lymphocytes of transgenic mice. *J. Immunol.* **159**, 5336.
- Veis, D. J., Sorenson, C. M., Shutter, J. R. & Korsmeyer, S. J. 1993. Bcl-2-deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair. *Cell*. **75**, 5269.
- Verwilghen, J. Lovis, R., De Boer, M., Linsley, P. S., Haines, G. K., Koch, A. E. & Pope, R. M. 1994. Expression of functional B7 and CTLA-4 on rheumatoid synovial T cells. *J. Immunol.* **153**, 1378.
- Waterhouse, P., Penninger, J. M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K. P., Thompson, C. B., Griesser, H. & Mak, T. W. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CTLA-4. *Science*. **270**, 985.

Webb, L. M., Walmsley, M. J. & Feldmann, M. 1996. Prevention and amelioration of collagen-induced arthritis by blockade of the CD28 co-stimulatory pathway: requirement for both B7.1 and B7.2. *Eur. J. Immunol.* **26**, 2320.

White, E., 1996. Life, death, and the pursuit of apoptosis. *Gene Dev.* **10**, 1-15.

Williams, I. R., Ort, R. J. & Kupper, T. S. 1994. Keratinocyte expression of B7.1 in transgenic mice amplifies the primary immune response to cutaneous antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**, 12780.

Wong, S., Guerder, S., Visitin, I., Reich, E. P., Swenson, K. E., Flavell, R. A. & Janeway, C. A. Jr. 1995. Expression of the costimulator molecule B7.1 in pancreatic beta-cells accelerates diabetes in the NOD mouse. *Diabetes* **44**, 326.

Yang, J., Liu, X. & Bhalla, K. 1997. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science.* **275**, 1129-1132.

Young, F., Mizoguchi, E., Bhan, A. K. & Alt, F. W. 1997. Constitutive Bcl-2 expression during immunoglobulin chain-promoted B cell differentiation expands novel precursor B cells. *Immunity.* **6**, 23.